



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL



**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR Y ANÁLISIS DE LAS HOJAS
DE *Salvia officinalis***

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Jesús Manuel Gutiérrez Pereira
C.I.V- 20.851.506

Tutor:

MsC. Joel Lara

Mérida, Junio 2019.

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR Y ANÁLISIS DE LAS HOJAS
DE *Salvia officinalis***

Presentado por:

Jesús Manuel Gutiérrez Pereira

Para optar al título de:

www.bdigital.ula.ve

LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

Tutor:

MsC. Joel Lara

Mérida, Junio 2019.

DEDICATORIA

Lucca Micaías... for you, because even being far away you make my days brighter.
Because you are the energy that allows me to stand. I love you nephew.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Tantos días de esfuerzo se ven recompensados con este momento único, Pero esto ha sido un trabajo en equipo; ese equipo al que quiero agradecer.

A Dios, la gloria sea para Él.

A mis padres, Carlos y Yalitz. A Uds. les debo no haber renunciado en los momentos de desánimo, que fueron muchos. Solo me resta decirles GRACIAS. Esto es por Ustedes y para Ustedes.

A mis tías Carmen y Ana Rosa, han sido pilares fundamentales, sus consejos me ayudaron a no rendirme nunca. Ustedes son mi punto de apoyo.

A mi tía Laura, gracias por apoyarme en todo momento y darme ánimo, gracias a tus consejos entendí que todo se basa en tener constancia y fe.

Judith, Luis y Orlando nuestra hermandad ha demostrado que todo con sacrificio se puede ustedes son fuente de inspiración, mil gracias por tanto.

A mis hermanos, Rodolfo, Kenda, Héctor y yismelvy, con esto sigo su ejemplo. Aquí estoy diciendo que sí lo logramos. Gracias, porque sin su ayuda todo hubiese sido más difícil.

Al Profesor Joel Lara, gracias por aceptar guiarme en este empeño, por las sugerencias y por el respeto a las mías. Como tutor, fue lo que necesité para alcanzar el éxito en esta investigación.

A las Profesoras Yndra y Rosa, gracias por su apoyo en esta investigación.

A mis amigos y compañeros de la Universidad, Uds. Siempre ahí, acompañándome, dándome ánimos, aunque a veces los suyos también estaban cabizbajos. ¡Finalmente lo logramos!

A la Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, lugar donde se aprende a ser profesional pero sobre todo a ser más humano.

ÍNDICE GENERAL

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	2
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA	11
RESUMEN	11
REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA	12
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO I	17
EL PROBLEMA	17
Planteamiento del problema.....	17
Objetivos de la investigación	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Justificación	19
Alcances y limitaciones.....	21
Alcances de la investigación	21
Limitaciones de la investigación	21
CAPÍTULO II	23
MARCO TEÓRICO	23
Antecedentes de la investigación	23
Trabajos previos.....	23
Bases teóricas	26
Familia Lamiaceae (Labiatae)	26
Características y aspectos botánicos	26
Taxonomía de la familia Lamiaceae	28
Figura 1. Un ejemplo de Lamiaceae: Salvia officinalis en Köhler's Medicinal Plants, 1897.	29
Distribución geográfica de la familia Lamiaceae	29
Figura 2. Localización geográfica mundial de la familia Lamiaceae	30

Fuente: Farnsworth, y Binge. 1977.....	30
Importancia de la familia Lamieaceae	30
Género <i>Salvia</i>	31
Características botánicas de la <i>Salvia</i>	31
Actividades farmacológicas y usos del género <i>salvia</i>	31
Especie <i>Salvia officinalis</i> L	33
Historia	33
Taxonomía de <i>Salvia officinalis</i> L	33
Características botánicas de <i>Salvia officinalis</i> L	34
Figura 3. <i>Salvia officinalis</i> L.....	35
Fuente: Bozin y col. 2007.....	35
Figura 4. Flor de <i>Salvia officinalis</i> L.....	35
Composición química de <i>S. officinalis</i> L	36
Figura 5. Componentes químicos de <i>Salvia officinalis</i> L.	37
Actividades farmacológicas de <i>S. officinalis</i> L	37
Usos de <i>S. officinalis</i>	38
Distribución geográfica	39
Figura 6. Localización geográfica de <i>S. officinalis</i>.	39
Toxicidad y efectos adversos	40
Actividad antibacteriana de <i>Salvia officinalis</i> L	41
Metabolitos secundarios.....	42
Clasificación de los Metabolitos Secundarios	43
Alcaloides	44
Terpenos	44
Triterpenos y esteroides	45
Saponinas	45
Compuestos fenólicos.....	46
Flavonoides	48
Cumarinas	48
Quinonas	49
Extractos de las hojas de <i>Salvia officinalis</i> L.....	50
Técnicas utilizadas para la preparación de extractos vegetales	51
Métodos de extracción discontinua	53
Métodos de extracción continua.....	55
Figura 8. Percolador.....	56
✓ Extracción con Soxhlet	56
Figura 9. Equipo Soxhlet.....	57
Bioensayos para el análisis antibacteriano	57
Metodologías para evaluar la Actividad Antibacteriana	58
Técnica de difusión en placa	59

Métodos en agar	60
Método de difusión por discos	60
Método modificado de pozos de agar	61
Métodos de dilución	61
Método de dilución en agar.....	61
Métodos en medio de cultivo líquido	62
Método de Mitscher	63
CAPÍTULO III.....	65
MARCO METODOLÓGICO	65
Tipo y diseño de investigación.....	65
Tipo de investigación	65
Diseño de la investigación.....	65
Población y muestra.....	66
Sistema de variables.....	66
Tabla 1. Operacionalización de las variables.	67
Hipótesis	67
Instrumento de Recolección de Datos	68
Materiales y equipos	68
Reactivos:.....	69
Procedimiento experimental.....	69
Recolección e identificación de la muestra (Hojas frescas de <i>S. officinalis</i> L).....	69
Preparación del material vegetal	69
Obtención del extracto de las hojas de <i>Salvia officinalis</i> L	70
Determinación del perfil fitoquímico de <i>Salvia officinalis</i> L	72
Reconocimiento de Alcaloides	72
Reconocimiento de esteroides y/o triterpenos	72
Reconocimiento de componentes fenólicos.....	73
Reconocimiento de flavonoides	73
Reconocimiento de quinonas/ antraquinonas.....	73
Reconocimiento de cumarinas	73
Reconocimiento de saponinas	73
Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>Salvia officinalis</i> L....	74
Microorganismos	74
Preparación de las placas	74
Aislamiento de las cepas	75
Prueba de susceptibilidad antibacteriana.....	75
Técnica de difusión en pozo en Agar (Kirby-Bauer) modificado	75
Lectura de los halos de inhibición	76
CAPÍTULO IV	77
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	77
Resultados obtenidos de la obtención de los extractos de <i>Salvia officinalis</i> L	77

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento del extracto de <i>S. officinalis</i>.....	79
Resultados obtenidos de la identificación de metabolitos secundarios de <i>S. officinalis</i> L.....	79
Tabla 3. Resultados del tamizaje Fitoquímico para la <i>Salvia officinalis</i>.....	82
Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de las hojas de <i>Salvia officinalis</i> L.....	83
Tabla 4. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>S. officinalis</i> L.....	83
CAPÍTULO V	86
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
Conclusiones:	86
Recomendaciones:	86
BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables.	67
Tabla 2. Porcentaje de rendimiento del extracto de <i>S. officinalis</i>	79
Tabla 3. Resultados del tamizaje Fitoquímico para la <i>Salvia officinalis</i> .	82
Tabla 4. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>S. officinalis</i> L	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Un ejemplo de Lamiaceae: <i>Salvia officinalis</i> en Köhler's Medicinal Plants, 1897.	29
Figura 2. Localización geográfica mundial de la familia Lamiaceae	30
Figura 3. <i>Salvia officinalis</i> L	35
Figura 4. Flor de <i>Salvia officinalis</i> L	35
Figura 5. Componentes químicos de <i>Salvia officinalis</i> L.	37
Figura 6. Localización geográfica de <i>S. officinalis</i> .	39
Figura 7. Equipo de reflujo	55
Figura 8. Percolador	56
Figura 9. Equipo Soxhlet	57

www.bdigital.ula.ve



RESUMEN

Evaluación fitoquímica preliminar y análisis de las hojas de *Salvia officinalis*

Autor: Jesús M, Gutiérrez P. Tutor: MsC. Joel Lara.

Salvia officinalis L, comúnmente llamada salvia, se considera como una planta rica en propiedades curativas, por lo tanto ha sido objeto de estudios a lo largo de la historia. Es por eso, que este trabajo forma parte de esa gama de investigaciones que se orientan a la evaluación fitoquímica preliminar y análisis de la *Salvia officinalis* L. Con un diseño experimental confirmatorio, bajo un enfoque cualitativo, el objetivo fue evaluar el perfil fitoquímico de las hojas de la especie *Salvia officinalis* L recolectada en el estado Mérida, así como también la actividad antibacteriana que ésta posee. La muestra fue representativa y con ella se logró detectar los metabolitos secundarios de la planta, dando como resultado la detección de alcaloides, esteroides, componentes fenólicos, flavonoides, no se detectó presencia de quinonas ni cumarinas. Asimismo, el extracto obtenido sirvió como base para evaluar su actividad antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, expresando sensibilidad para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y resistencia para *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Palabras Clave: *Salvia officinalis* L. Fitoquímica. Metabolitos secundarios. Actividad antibacteriana.



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL



ABSTRACT

Preliminary phytochemical evaluation and analysis of the leaves of *Salvia officinalis*

Author: Jesús, M. Gutiérrez, P. Tutor: MsC. Joel Lara.

Salvia officinalis L., commonly called sage, is considered as a plant rich in healing properties, therefore it has been the subject of studies throughout history. That is why this work is part of this range of investigations that are oriented to the preliminary phytochemical evaluation and analysis of *Salvia officinalis* L. With an analytical confirmatory design, under a qualitative approach, the objective was to evaluate the phytochemical profile of the leaves of the species *Salvia officinalis* L collected in the state of Merida. The sample was representative and with it, it was possible to detect the secondary metabolites of the plant, resulting in the detection of alkaloids, sterols, phenolic components, flavonoids, no presence of quinones or coumarins, and a weak positive for saponins. Therefore, the extract obtained was the base to evaluate the antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, expressing sensibility to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and resistance for *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Keywords: *Salvia officinalis* L. Phytochemistry. Secondary metabolites. Antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha intensificado la investigación científica para extraer y separar sustancias de las plantas, con actividad biológica o terapéutica (Albornoz, 1980), puesto que este recurso natural se ha utilizado desde hace muchos años como alternativa medicinal en el tratamiento de muchas enfermedades. No sólo, las plantas se han empleado como herramienta para el tratamiento de dolencias y enfermedades, sino también, el hombre ha conseguido satisfacer sus necesidades fundamentales (alimento, abrigo, casa, fabricación de utensilios, etc.) a través de ellas. Es entonces que su uso farmacológico está dado por el estudio de la composición química de los productos naturales que desde hace varios años, ha sido tema de investigación alrededor del mundo (Ramírez, 2012).

Desde la prehistoria, se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones, y aún las plantas sin tratamiento se han empleado para los mismos fines. Los primeros escritos que se tienen del uso de las plantas con fines medicinales refieren a Hipócrates y Sócrates; incluso, Dioscórides (77 a.c.) escribió *Materia Médica*, una obra considerada durante 15 siglos como la cumbre de la botánica y farmacia, en ella registró todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos e incluyó desde la simple descripción hasta su utilización (Marcano y Hasegawa, 1991).

Marcano y Hasegawa (1991) indican que el nuevo mundo es particularmente rico en plantas, por ejemplo, hay 80-100 especies con características alucinógenas y probablemente más que no han sido descubiertas o de las que no se tiene registro. Existe una vasta información sobre la flora americana y su uso, en Venezuela existen varias obras pero la más famosa es la de Henry Pittier (1926) que describe las plantas de acuerdo con su clasificación botánica y su uso. (Ramírez, 2012)

Domínguez (1973), estipula que la etnobotánica trata de recopilar los conocimientos sobre la composición precisa de las plantas, cubriendo aspectos referidos a la estructura de constituyentes químicos, actividad biológica, extracción y purificación, datos espectroscópicos, síntesis y biosíntesis, así como también trabajos fitoquímicos con el fin de estudiar y aislar los componentes principales de las plantas. Es así que los métodos químicos para la determinación de las estructuras se han ido desarrollando en una serie de técnicas físicas de separación, purificación e identificación (RMN, IR, UV, Rayos X, técnicas cromatográficas, solas o combinadas con métodos espectroscópicos tales como EM-CG, HPLC).

Tomando en consideración los incisos anteriores, hoy en día, las plantas siguen siendo tema de investigación por lo que se considera importante el estudio del género *Salvia*, puesto que se trata de una planta empleada ampliamente en la industria alimentaria, perfumística y farmacéutica, su interés dentro de este último apartado es debido al uso que en medicina tradicional se ha hecho de distintas especies del género *Salvia* para el tratamiento de una amplia gama de afecciones contando en muchos casos con la validación científica de dichos usos terapéuticos (Lu y Foo, 2000).

De la *Salvia* y de otras muchas plantas aromáticas y medicinales se utilizan sus aceites esenciales, sus extractos o sus partes (hojas, flores, raíces) como ingredientes de diversas preparaciones y productos comerciales para el consumo humano. En la búsqueda de una caracterización fitoquímica y explicación molecular de la actividad biológica de la *Salvia* se ha demostrado que en sus metabolitos secundarios se encuentran varias sustancias que poseen alta capacidad antioxidante, tales como los ácidos fenólicos rosmarínico, salvianólico y ursólico, los flavonoides luteolina y salvicoumarina y los diterpenos fenólicos ácido carnósico, carnosol y rosmanol (Wang, y col., 1998).

Por esta razón, en este trabajo de investigación, se pretende ahondar en la evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de la *Salvia* pero específicamente de la *Salvia officinalis* ya que es una planta medicinal utilizada desde la antigüedad y ha llegado a nuestros días por todas las virtudes que se le atribuyen, aunado a esto, esta especie se encuentra en distintas regiones de Venezuela y por lo tanto se ha usado para el tratamiento de distintas enfermedades de manera popular, es decir, la población ha hecho uso de la planta sin poseer un conocimiento amplio sobre sus componentes, por lo tanto, demanda gran importancia apoyar tal uso pero bajo un criterio científico comprobado a través de técnicas de laboratorio que arrojen información veraz sobre la composición química de la especie vegetal.

Es así, que partiendo de ciertos criterios como la historia, uso y características del género y especie, esta investigación pretende ofrecer un estudio preliminar comprobado por técnicas de extracción, separación y tratamiento de la planta, asimismo, evaluar las propiedades como agente antimicrobiano que, permita un conocimiento objetivo sobre la misma, a saber, composición química de la *Salvia officinalis* y su actividad antibacteriana.

Por esto, este trabajo de investigación se encuentra estructurado de la siguiente manera: Capítulo I, en el que se plantea el problema de estudio, junto con los objetivos que se quieren alcanzar, la importancia del trabajo y los alcances y limitaciones del mismo; el capítulo II muestra los antecedentes referidos a investigaciones en el que se apoya este trabajo, asimismo, las teorías en las que se fundamenta este estudio; en el capítulo III se encuentra el tipo de investigación y toda la metodología empleada; el capítulo IV trata los resultados obtenidos luego del procedimiento metodológico usado, también, la discusión de tales resultados; finalmente el capítulo V en el que

se incluyen las conclusiones que derivaron del estudio, sin dejar de mencionar las recomendaciones que se ofrecen.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Las plantas medicinales se han usado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades. Su uso terapéutico ha sido sistemáticamente estudiado desde hace dos siglos bajo un enfoque científico. A pesar de que con el descubrimiento de la penicilina, se pensaba que la fitoterapia pasaba a un segundo plano, ya que el uso de los antimicrobianos se volvió generalizado (Miguel y col, 2011) hoy en día, las terapias naturales siguen siendo foco de investigación. Actualmente, existe un renovado interés por lo natural y lo orgánico y ha propiciado el surgimiento de los extractos naturales generando nuevas líneas de investigación y nuevas alternativas terapéuticas (De Paula y Martínez, 2000).

Esto hizo que se indagara y se estudiara de manera profunda y constante, el conocimiento de las composiciones químicas de las especies vegetales, que poseen propiedades farmacológicas, y ampliar las diferentes funciones de los productos que de ellas se extraen, a saber, sus propiedades antibacterianas, para el uso farmacológico propiamente dicho (Padrón, 2010; Albornoz, 1997).

En lo que respecta a la investigación de productos naturales nuevos e innovadores se ha generado un número importante de publicaciones tanto nacionales como internacionales y se han aislado y caracterizado miles de sustancias químicas pertenecientes a diferentes familias de plantas que contienen metabolitos secundarios de importancia para la salud humana tales como flavonoides, alcaloides y terpenoides, entre otras; compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleados en el combate de diferentes enfermedades. Entre los metabolitos secundarios importantes

relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

En los últimos años se han hecho importantes contribuciones en la prospección de la actividad biológica de un importante número de estas sustancias. La mayoría se refieren a plantas terrestres incluidas las de uso medicinal, sin embargo; también se han estudiado los productos naturales de origen animal, que presentan propiedades terapéuticas (Sharapin, 2000).

Las plantas del género *Salvia*, con cerca de 900 especies han sido utilizadas en fitopreparaciones y productos alimenticios en todo el mundo. La especie más popular, *Salvia officinalis* se ha empleado de manera extensiva en la preparación de alimentos como agente preservante y como especia, en la industria cosmética, como protector de la radiación UV y el tratamiento de una gran variedad de enfermedades (López, Cataño, y Mejía, 2013).

Las hojas de *Salvia* son ricas en flavonoides y en aceite esencial que le confiere una aromática fragancia. La *Salvia* posee propiedades: antisudorífica, emenagoga, tonificante, antiespasmódica, colerética, hipoglucemiante, estimulante, astringente y antiséptica, disminuyendo las posibilidades de enfrentar efectos secundarios que se producirían al utilizar fármacos convencionales (Bozin, Mimica, Samojlik, y Jovin, 2007).

Por esta razón, la *Salvia officinalis* L. resulta ser la unidad de estudio en esta investigación, partiendo de los enunciados expuestos anteriormente; con ésta, se persigue la evaluación fitoquímica preliminar de la planta, para brindar información segura y verificada sobre la composición química de la especie, y de esta manera, indagar acerca de los elementos que la componen, del mismo modo, explorar en las propiedades terapéuticas realizando un estudio de la actividad antibacteriana de *Salvia officinalis* L, que, según la literatura, ha permitido la cura de diversas enfermedades

desde tiempos remotos. Por lo tanto, la presente investigación pretende profundizar en el tema a través de la siguiente interrogante:

¿Cuál es la composición química y actividad antibacteriana de las hojas de la especie *Salvia officinalis* L?

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Evaluar el perfil fitoquímico y actividad antibacteriana de las hojas de la especie *Salvia officinalis* L recolectada en el estado Mérida.

Objetivos específicos

- Obtener los extractos de las hojas de *Salvia officinalis* L a través del método de extracción discontinuo llamado digestión o reflujo.
- Identificar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Salvia officinalis* L.
- Explorar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de las hojas de *Salvia officinalis* L. usando el método de difusión en pozo.

Justificación

Históricamente, la inmensa mayoría de las investigaciones fitoquímicas desarrolladas hasta hace unas décadas estaban dirigidas a determinar estructuras novedosas. Hoy día esos estudios se orientan hacia el aislamiento e identificación de compuestos biológicamente activos, especialmente encausados a atacar dolencias que afectan a toda la humanidad (Marcano y Hasegawa, 1991).

Son innumerables los estudios relacionados con la evaluación de las propiedades de las plantas con fines terapéuticos, esto se debe a la alta

demanda de fármacos en el mundo de hoy. Las enfermedades de cualquier índole cada vez son más frecuentes a nivel mundial, ya sea por factores ambientales o inmunológicos, sin embargo, existen, en la naturaleza, una gran variedad de especies de origen vegetal que han venido a reemplazar las terapias sistematizadas químicamente, por ejemplo, antibióticos comerciales, que son altamente costosos, y, además, generan en el afectado complicaciones secundarias (Alonso, 2004).

Por este motivo, es importante el estudio de alternativas terapéuticas naturales, que, aunque se han implementado desde tiempos remotos, éstos han sido usados por la población sin el conocimiento de la composición química de las mismas (González y col, 2004).

El género *Salvia*, específicamente la especie *Salvia officinalis* L. ha sido empleada en la industria de perfumería y cosmética, incluso en la industria alimentaria, entre las principales actividades que se han demostrado para este tipo de *Salvia* cabe destacar su capacidad como agente antioxidante y sus efectos antiespasmódicos, astringente, diaforético, tonificante y antimicrobiano (Piccaglia y col, 1989).

Por otro lado, cabe mencionar que en Venezuela, conviene profundizar en estudios relacionados con las propiedades de productos de origen natural, ya que constituye un aporte a la salud de la población, por lo que afirman los estudios previos, se trata de una alternativa farmacológica de fácil adquisición y con resultados científicamente probados. Resulta indispensable ser parte de la solución al problema que enfrenta la salud de los venezolanos; hoy en día, el control de enfermedades bacterianas utilizando antibióticos, se ha convertido en un problema de salud, por el escaso recurso terapéutico y por los elevados costos de la mayoría de los antibióticos existentes en el mercado (Mora, 2016).

Alcances y limitaciones

Alcances de la investigación

Los alcances de esta investigación están relacionados principalmente con la importancia que han adquirido las plantas con propiedades medicinales en los últimos años. La especie *Salvia officinalis* L. ha sido ampliamente investigada alrededor del mundo, por lo tanto, se considera como una fuente de recursos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades. Por tal motivo, aportar nuevos datos sobre las características fitoquímicas y bioactividad de la planta es parte de los alcances contemplados en esta investigación, y así, ofrecer a la población, una alternativa asequible como opción terapéutica.

Limitaciones de la investigación

Entre las limitaciones que se presentaron durante la investigación, resaltan las siguientes:

- Dificultad para la recolección de la planta, aunque su uso es común entre la población y puede localizarse en la zona de los Andes, en la ciudad de Mérida se imposibilitó encontrarla, puesto que pese a que existen mercados (Mercado Principal de Mérida, Mercado Periférico, Mercado Murachí, Mercado Soto Rosa, Mercado Av. 2 Lora, entre otros sitios de referencia) en donde se comercializan distintas especies de diferentes plantas, no fue posible encontrarla, lo que obligó la búsqueda por zonas aledañas a la ciudad, encontrándose la especie en la población de Chiguará, Municipio Sucre, estado Mérida, Venezuela.
- Disponibilidad del laboratorio para llevar a cabo el estudio, siendo afectado por protestas, cierres constantes de la institución, entre otros.

- Intervención de variables externas que alteraron la investigación, como transporte, fluido eléctrico y capital necesario.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes de la investigación

Trabajos previos

Las siguientes investigaciones representan punto de referencia en este estudio destinado a la evaluación fitoquímica preliminar y análisis de las hojas de la *Salvia officinalis* L.

Martínez, Ruiz, Arias y Stashenko (2014), desarrollaron una investigación titulada “Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO₂ supercrítico” en el que se seleccionaron las variables con mayor efecto sobre la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y el rendimiento de la extracción utilizando CO₂ supercrítico como solvente sobre hojas y tallos de *Salvia officinalis* L. El material vegetal de la especie bajo estudio se cosechó en el municipio de Sucre, Santander, Colombia. Se utilizó CO₂ de 99,9 % de pureza. El metanol y el etanol empleados como solventes fueron de grado analítico, al igual que el reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N) y KH₂PO₄ (99 %). Las hojas, tallos y flores, se secaron bajo condiciones de temperatura y humedad ambientales y protegidas de la luz solar y del agua. Luego se picó el material vegetal manualmente y se pasó por un molino de cuchillas, hasta alcanzar un tamaño promedio de 1 mm. Se realizaron extracciones por duplicado para determinar el rendimiento de extracción y así escoger los parámetros adecuados para los experimentos de análisis de variables y de optimización. Se determinó la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles a través de los métodos de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y Cromatografía líquida. Con esto, se obtuvo un conjunto reducido de variables en cuyo subespacio se hallaron condiciones para la extracción de

metabolitos secundarios de *S. officinalis* L con un desempeño superior en la combinación de capacidad antioxidante, contenido de fenoles y rendimiento de extracción.

En este orden de ideas, en Brasil; Porte, Godoy, Maia-Porte (2013), llevaron a cabo un estudio titulado “Composición química del aceite esencial de *Salvia* (*Salvia officinalis* L) del estado de Rio de Janeiro (Brasil)” en esta investigación, los autores definieron los aspectos importantes de la planta objeto de análisis, tomando en consideración estudios relacionados con la misma, centrando su atención en los múltiples usos del aceite esencial de las hojas de la especie vegetal, haciendo énfasis que en Brasil, el extracto de la planta es usado en la industria alimentaria y por supuesto en el campo farmacológico, con actividad antimicrobiana científicamente probado, por lo tanto, decidieron profundizar en la composición química del aceite esencial extraído de *Salvia officinalis* L. de Rio de Janeiro para comercio internacional. Las plantas fueron recolectadas en la fase de florecimiento (Diciembre). Las hojas frescas fueron sometidas a hidroddestilación. La extracción se hizo en duplicado, luego se calculó el rendimiento de secado. El aceite fue aislado por arrastre en vapor en el aparato de Clevenger y analizado por CG-DIC y CG-EM. El rendimiento fue de 2,3 % en base seca. Cuarenta y siete sustancias fueron identificadas de acuerdo con sus índices de retención en espectros de masas, correspondiendo a 94,90 % de los compuestos presentes en el aceite. Los principales constituyentes del aceite fueron: α -tujona (40,90 %), canfor (26,12 %), α -pineno (5,85 %) y β -pineno (5,62 %).

Ese mismo año, en Colombia, Lina y col (2013), evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, siendo éste el objetivo de su investigación. Para determinar su efectividad como alternativa en la conservación de alimentos se comparó con la actividad antimicrobiana de compuestos químicos utilizados ampliamente en la industria de alimentos.

El aceite esencial de *S. officinalis* L. demostró un amplio espectro de inhibición microbiana sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. La concentración inhibitoria mínima (CIM) estuvo entre 1 y 4 mg/mL para todas las bacterias evaluadas. Estos resultados muestran que el aceite esencial de *S. officinalis* L. puede ser utilizado para mejorar la inocuidad y tiempo de vida útil de productos alimenticios.

Por su parte, Sierra, González, Marrero y Rodríguez en el año 2011 ampliaron un estudio destinado al “Análisis fitoquímico de la *Salvia coccinea* que crece en Cuba”. Hasta ese momento, a las plantas de esta especie que crecen en Cuba no se le habían realizado estudios fitoquímicos. El objetivo de la investigación fue realizar un tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de tallos, flores y hojas de la especie *Salvia coccinea* L. La metodología se enmarcó en la recolección de los tallos, así como las hojas y flores. Los extractos se filtraron y se les hicieron las pruebas fitoquímicas. A las porciones de la planta seca se le determinó la presencia de glicósidos cianogenéticos y a los extractos se les determinó la presencia de saponinas, mucílagos, principios amargos y astringentes, aceites esenciales y grasas, alcaloides, grupos amino, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides, leucoantocianidinas coumarinas, carotenos, glicósidos cardiotónicos, quinonas, triterpenos y esteroides los que pudieran tener interés farmacológico potencial.

Asimismo, en el año 2010, López, Sánchez y Román realizaron una investigación cuyo objetivo fue el “Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima*” Ort. El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de *Salvia amarissima* mediante la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer) y la técnica de dilución del antimicrobiano en agar, así como detectar los compuestos responsables de ésta mediante su análisis fitoquímico para contribuir en el descubrimiento de compuestos bioactivos. En este trabajo se

evaluó por primera vez la actividad antimicrobiana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso obtenidos de la planta, los cuales se probaron en 8 cepas de microorganismos de referencia por las técnicas de Kirby- Bauer y la de dilución del antimicrobiano en agar. La caracterización fitoquímica preliminar demostró que las moléculas del extracto hexánico no poseen moléculas con actividades biológicas. Así también, el estudio demostró que el extracto metanólico presenta moléculas con actividades biológicas, que será interesante aislar y caracterizar para corroborar las actividades biológicas que se le atribuyen. Se probaron los extractos acuosos liofilizados y desecados a temperatura ambiente, así como los extractos orgánicos hexánico y metanólico de la planta *Salvia amarissima* Ort. y no se observó actividad antimicrobiana por las técnicas de difusión (Kirby-Bauer) y la de dilución en agar. Por último, se llevó a cabo un análisis preliminar espectroscópico de los compuestos presentes en cada extracto.

Los estudios mencionados en los incisos anteriores se relacionan con el trabajo en desarrollo, puesto que además de emplear métodos similares para la identificación de metabolitos secundarios, y, evaluar actividad biológica, en su mayoría, usaron como planta bajo análisis especies de género *Salvia*, aportando información valiosa en el logro de los objetivos de esta investigación.

Bases teóricas

Familia Lamiaceae (Labiatae)

Características y aspectos botánicos

Las Lamiaceae están representadas por 3000 especies distribuidas por todo el mundo, y particularmente en la región mediterránea, que representa el principal centro de diferenciación de la familia. Las Lamiaceae

comprenden tanto formas herbáceas, anuales y perennes, como caméfitos y nanofanerófitos (*Teucrium fruticans*). El aparato vegetativo está caracterizado por el tallo de forma cuadrangular, debido a la presencia de engrosamientos de colénquima en los ángulos; las hojas que son opuestas y sin estípulas; y presenta glándulas con aceites volátiles de aromas característicos. Las flores forman inflorescencias espiciformes, verticilos de flores superpuestos, en las axilas de las hojas o brácteas superiores, y, algunas veces, existen bracteolas en la base de cada flor. El cáliz está constituido por 5 sépalos soldados que forman un tubo actinomorfo o zigomorfo bilabiado. La corola, gamopétala, está formada por 5 pétalos y es, casi siempre, zigomorfa y bilabiada, con un labio superior que consta de 2 piezas y un labio inferior de 3. (Stevens, 2013). Algunas especies se alejan de este esquema y, por tanto, se distinguen algunos géneros con corola actinomorfa, formada por un tubo con dientecillos apicales más o menos iguales entre sí (*Mentha*), y géneros con corola unilabiada según el plano 0/3, es decir, sin labio superior (*Ajuga*), o, también, 0/5 por la fusión de las 5 piezas corolinas en un único cuerpo, representando sólo un labio inferior (*Teucrium*). El androceo está formado por 4 estambres (el quinto, posterior, está casi siempre atrofiado) de los cuáles 2 son más largos (didínamo); algunas veces pueden estar presentes sólo 2 estambres (*Salvia*). El gineceo, súpero, es bicarpelar y contiene 4 óvulos (Govaerts y col, 2011).

Según Miguel y col (2011) las labiadas son utilizadas tradicionalmente, en la región mediterránea, como plantas aromáticas, por esto son cultivadas y recolectadas, en algunos casos en la mismas poblaciones naturales. Entre las más conocidas están la albahaca (*Ocimum basilicum*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), el orégano (*Origanum heracleoticum*), la mejorana (*O. majorana*), la salvia (*Salvia officinalis*), el tomillo (*Thymus vulgaris*), la menta (*Mentha piperita*), el toronjil (*Melissa officinalis*), la calamintha (*Calamintha nepeta*); de algunas especies, como del hisopo (*Hyssopus*

officinalis) y el espliego (*Lavandula angustifolia*), se conocen y utilizan sus propiedades medicinales. Como autóctonas hay bastantes y de notable importancia.

En particular, los autores destacan que, muchas prefieren hábitats nemorales en el interior de bosques mesófilos (*Melittis albida*), o termófilos perennes (*Teucrium siculum*). De todas formas, la mayor parte prefiere los ambientes abiertos y soleados, formando parte de la maquia y la garriga (*Phlomis fruticosa*, *Salvia triloba*), de los pastos húmedos (*Prunella vulgaris*); y como acompañantes terofíticos efímeros (*Sideritis romana*).

Taxonomía de la familia Lamiaceae

Según Fiori y Bég (1986), la familia Lamiaceae taxonómicamente se divide de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Es así como Watson y Dallwitz, (1992) estipulan que las lamiáceas (Lamiaceae), anteriormente y alternativamente Labiatae (labiadas), son una familia de plantas con flores del orden Lamiales que comprende unos 245 géneros y alrededor de 7.900 especies taxonómicamente admitidos, lo que la convierte en uno de los mayores grupos del actual Reino vegetal. Del mismo modo, Köhler's Medicinal Plants, 1897, ilustró la planta, estudiando sus partes con interés científico.

Figura 1. Un ejemplo de Lamiaceae: *Salvia officinalis* en Köhler's Medicinal Plants, 1897.



Distribución geográfica de la familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae es de ubicación Cosmopolita, excepto en las zonas polares (ártica y austral) y los desiertos extremos (Sahara, excepto las oasis, Desierto de Gobi, Arabia - Rub al-Jali, An-Nafud). Esencialmente representada en el Mediterráneo y el suroeste de Asia y apenas en los bosques tropicales (Martínez, 1991).

A continuación, se presenta la representación gráfica de la localización geográfica de la familia Lamiaceae (Figura 2).

Figura 2. Localización geográfica mundial de la familia Lamiaceae



Fuente: Farnsworth, y Binge. 1977

www.bdigital.ula.ve

Importancia de la familia Lamiaceae

Un gran número de labiadas son cultivadas como ornamentales. Desde el punto de vista de sus propiedades fitoquímicas interesa mencionar la presencia de terpenos. En algunos casos estas sustancias actúan como inhibidores de crecimiento de otras especies, este fenómeno se denomina alelopatía. En países de Latinoamérica existen numerosas especies utilizadas en medicina popular, entre ellas se pueden citar: *Minthostachys mollis*, *Mentha rotundifolia*, *Mentha piperita* L. (menta), *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum* sp., *Salvia officinalis* L. Se usan en la preparación de infusiones por sus propiedades digestivas, somníferos, antiespasmódicos, astringentes, y también en el campo culinario como condimento para las comidas. Por su fragancia, es usado en industrias perfumísticas (González y col, 2004).

Género *Salvia*

Con el nombre de salvias se conoce una serie de plantas, pertenecientes al género botánico *Salvia*. Este nombre deriva del latín *salvere* (ser salvado) debido a sus cualidades curativas, que son conocidas desde la antigüedad y gozan de la consideración de panacea. La *Salvia* fue empleada por egipcios, griegos y romanos en el tratamiento de ulceraciones. Ya Plinio el Viejo le adjudicaba un efecto beneficioso para incrementar la memoria y en forma de deccociones o vinos para el tratamiento de afecciones de la cavidad bucofaríngea (Pino y col, 1997).

Características botánicas de la *Salvia*

El género de la *Salvia* es muy amplio (incluye aproximadamente 3000 especies) y pertenece al orden Lamiales, a la familia Lamiaceae, esta se encuentra distribuida por todo el mundo. Se trata de plantas herbáceas con tallos tetragonos, hojas simples, opuestas y decusadas carentes de estípulas y flores en inflorescencias bracteadas, cimosas o racemosas. Las flores son zigomorfas y pentámeras con cáliz bilabiado persistente con 5 sépalos parcialmente soldados en una estructura tubulosa. La corola está constituida por 5 pétalos soldados. Por lo general, son plantas muy aromáticas, muchas de ellas aclimatadas a los países mediterráneos. Algunas especies pertenecientes a este género tienen interés en jardinería como ornamentales (Pino y col. 1997).

Actividades farmacológicas y usos del género *salvia*

Las propiedades antibacterianas de estas plantas, debidas a la presencia de terpenoides, han sido ampliamente descritas. Por ello se emplean tradicionalmente en diferentes países. Además, algunas especies de *Salvia* han mostrado actividades farmacológicas de interés. El extracto

acuoso de *S. africanaalutea* L. presenta actividad analgésica y antipirética en el ratón (Amabeoku y col, 2001)

Algunos diterpenos naftoquinónicos (aetiopinona) identificados en la raíz de *S. aethiopsis* han mostrado actividad antiinflamatoria y analgésica central y periférica (Hernández y col, 1995) que parecen estar relacionadas con una inhibición de 5- LO (Benrezzouk y col, 2001).

Algunas especies han mostrado actividad hipoglucemiante como es el caso de *Salvia fruticosa* Mill., recolectada en Chipre, que en forma de extracto acuoso disminuye la absorción intestinal de glucosa en conejos (Perfumi y col, 1991).

El caso de *Salvia lavandulifolia* Vahl. ssp. *Oxydon* que reduce los niveles de glucosa a través de un mecanismo de acción complejo en el que interviene una potenciación de la liberación de insulina acompañada de hiperplasia de las células b-pancreáticas, un incremento de la captación periférica de glucosa y una inhibición de su absorción intestinal (Jiménez y col, 1986; Zarzuelo y col, 1990).

En los últimos años ha adquirido una notable importancia una especie de origen chino, *Salvia miltiorrhiza* Bunge, denominada Tan Seng, Tanshen o Dansen, cuyos órganos subterráneos (raíces y rizomas) son empleados en medicina para el tratamiento de afecciones coronarias, especialmente angina de pecho e infarto de miocardio, aterosclerosis cerebral, tromboembolismo y tromboflebitis (Kintzios, 2000).

El elevado número de investigaciones farmacológicas y clínicas realizadas sobre esta especie demuestran que se trata de una planta altamente efectiva para el tratamiento de distintas afecciones.

Especie *Salvia officinalis* L

Historia

Desde la antigüedad, se ha utilizado *Salvia officinalis* para alejar el mal, mordeduras de serpientes, aumentar la fertilidad de las mujeres, y más. Teofrasto escribió sobre dos salvias diferentes, una un arbusto salvaje la llamó sphakos y la otra una planta cultivada similar la llamó elelisphakos. Plinio el Viejo dijo de esta última planta que se llamaba salvia por los romanos, y se utilizaba como un diurético, un anestésico local para la piel, un astringente y para otros usos. Carlomagno en su edicto Capitulare de villis vel curtis imperii artículo nº 70, recomienda la planta para el cultivo en la Alta Edad Media, y durante el Imperio Carolingio, para que se cultive en los jardines de los monasterios. Walafrido Strabo la describió en su poema Hortulus por tener un aroma dulce y ser útil para muchas dolencias humanas y se dirigió de nuevo a la raíz griega para el nombre y la llamó lelifagus (Watters, 1901).

La planta tenía una gran reputación en toda la Edad Media, con muchos dichos en referencia a sus propiedades curativas y valor. A veces se llama *S. salvatrix* (salvia el salvador), y fue uno de los ingredientes del Vinagre de los cuatro ladrones, una mezcla de hierbas que se supone que debían proteger de las plagas. Dioscórides, Plinio y Galeno las recomendaban como diurético, hemostático, emenagogo y tónico (Kintzios, 2000).

Taxonomía de *Salvia officinalis* L

Salvia officinalis fue descrita por Carl Linnaeus en 1753. Ha sido cultivada por siglos en el Viejo Mundo por sus propiedades culinarias y medicinales y muchas veces ha sido descrita con propiedades curativas milagrosas. El epíteto específico *officinalis*, se refiere al uso medicinal,

officina, la cual fue una hierba tradicional en expendios medievales de los monasterios. *S. officinalis* ha sido clasificada con varias denominaciones taxonómicas.

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Tribu: Mentheae

Género: *Salvia*

Especie: *Salvia officinalis* L.

(Taxonomía según Watters, 1901)

Características botánicas de *Salvia officinalis* L

El género de la *salvia* es muy amplio (incluye aproximadamente 900 especies) y pertenece al orden Lamiales, a la familia Lamiaceae y esta se encuentra distribuida por todo el mundo. Es una planta perenne aromática de hasta 70 cm de altura. Tallos erectos y pubescentes. Hojas pecioladas, oblongas y ovales, más raramente lanceoladas, con la nervadura bien marcada (Fig. 3). Flores blanco-violáceas en racimos, con corola de hasta 3 cm, cuyo labio superior es casi recto; el cáliz es más pequeño que la corola con tonalidades púrpureas (Fig. 4). Se cultiva principalmente sobre suelos calcáreos. (Bozin y col., 2007)

Es un arbusto cuyas hojas, de tamaño variable según sea su posición en el tallo, son lanceoladas, pubescentes, de color gris verdoso y con la superficie rugosa. Las flores, agrupadas en verticilos, son de color azul-violáceo. La parte de la planta que se emplea como droga son las hojas. En numerosas farmacopeas figura como droga la hoja desecada, entera o troceada de la especie *Salvia officinalis* L sin embargo también en algunas se

considera como droga la *Salvia lavandulifolia* Vahl (antes subespecie de *Salvia officinalis* L.) o salvia de España y *Salvia sclarea* L. La monografía de *Salvia officinalis* L. publicada por The European Scientific Cooperative on Phytoteraphy (ESCOP) en marzo de 1996 indica que las hojas desecadas de salvia deben contener como mínimo un 1,5% V/m de aceite esencial. (Bozin y col., 2007)

Figura 3. *Salvia officinalis* L



Fuente: Bozin y col. 2007

Figura 4. Flor de *Salvia officinalis* L



Fuente: Bozin y col. 2007

Composición química de *S. officinalis* L

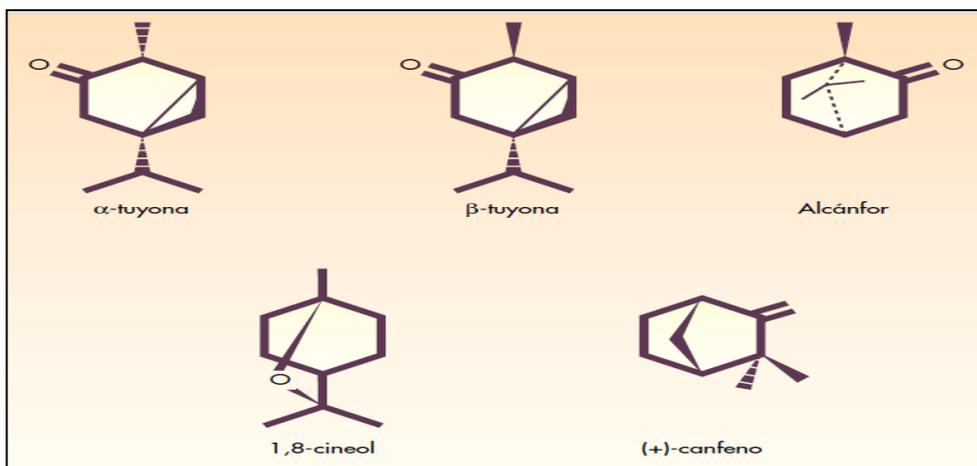
Todas las salvias presentan una composición química compleja con abundantes metabolitos de naturaleza terpénica: monoterpenos y sesquiterpenos constitutivos de sus aceites esenciales, diterpenos (carnosol, rosmanol, epirosmanol, ácido carnósico) y triterpenos derivados del ursano y oleanano. Además poseen abundantes compuestos fenólicos: flavonoides con sustituyentes sobre el C-6 y ácidos fenólicos, principalmente ácido rosmarínico (Hernández, Carretero y Accame. 2002).

S. officinalis L. contiene: aceite esencial (0,8-2,5%), taninos condensados (3-7%, salviatano), ácidos fenólicos (rosmarínico, cafeico, clorogénico, ferúlico, etc.), flavonoides (1-3%, luteolina, apigenina, genkwanina, hispidulina, cirsimarina, 5,6,7-4'-tetrametoxiflavona [5-O-metilsalvigenina], nepetina, cirsilol y sus heterósidos), α -D-glucósidos de timol, mentol y tuyol, diterpenos (carnosol, ácido carnósico y rosmanol), triterpenos (α -amirina y β -amirina, betulina y ácidos ursólico y oleanólico y sus derivados hidroxilados), fitosteroles (β -sitosterol, estigmasterol) (Lu y Foo, 2000; Wang y col, 2000; Miura y col, 2001). Los componentes mayoritarios del aceite esencial, cuyo contenido mínimo no debe ser inferior al 1,5% (v/m), son por lo general cetonas monoterpénicas bicíclicas: α -tuyona, y en menor proporción, β -tuyona. (Fig 5)

Además contiene alcanfor, 1,8-cineol y borneol libre y esterificado. Sin embargo, la composición de este aceite esencial varía considerablemente según el órgano vegetal utilizado en la extracción y la estación del año en que se haya recolectado. Por ejemplo, en estudios realizados sobre distintos cultivos de *S. officinalis* L. se ha comprobado que entre diciembre y abril desciende significativamente la concentración de monoterpenos oxigenados (α -tuyona y alcanfor) y aumenta el porcentaje de hidrocarburos

monoterpénicos (α -pineno y β -pineno y canfeno) (Santos y Fernández, 2001).

Figura 5. Componentes químicos de *Salvia officinalis* L.



Fuente: Santos y Fernandes, 2001

Actividades farmacológicas de *S. officinalis* L

A la *Salvia officinalis* le han sido atribuidas numerosas actividades farmacológicas en la medicina tradicional; sin embargo, sólo algunas han sido validadas científicamente. Según la Comisión Alemana de Estudios Fitoquímicos, las hojas manifiestan actividad antibacteriana, fungistática y virostática. Es además astringente e inhibidora de la sudoración. Estudios realizados en animales de experimentación (íleon de cobayo) han demostrado la actividad espasmolítica del aceite esencial. Parece ser que el efecto es debido a la presencia de alcanfor y acetato de bornilo. Por otra parte, el extracto hidroalcohólico es capaz de inhibir las contracciones inducidas por serotonina y acetilcolina, que se debe al efecto a los compuestos fenólicos (Newall, 1996).

Relacionado con esta actividad relajante de musculatura lisa intestinal hay que destacar el trabajo de Todorov y col (1984), que demuestra la actividad hipotensora en gatos del extracto hidro-alcohólico de esta planta, ya que tanto esta especie como *Salvia triloba* son capaces de inhibir las contracciones inducidas por acetilcolina, histamina, serotonina y BaCl₂.

También se ha comprobado en animales de experimentación la actividad antiinflamatoria. La aplicación tópica de los extractos hexánico y clorofórmico redujo significativamente el edema inducido por aceite de crotón en oreja de ratón y resultan inactivos tanto el extracto metanólico como el aceite esencial. Esta actividad antiinflamatoria parece estar relacionada con la presencia en los extractos de componentes triterpénicos como el ácido ursólico (Baricevic y col, 2001). La presencia de un elevado número de compuestos terpénicos le confiere una importante actividad antiséptica. El aceite esencial posee actividad antimicrobiana (frente a *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, distintas especies de *Salmonella*, *Klesbiella*, *Bacillus subtilis*) y antifúngica (*Candida*, *Torulopsism* y *Cryptococcus*) (Newall, 1996). Los diterpenos han mostrado igualmente actividad antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular (ESCOP). Los extractos acuosos son igualmente antisépticos y además poseen actividad antioxidante debido a los ácidos fenólicos libres y en forma heterosídica que contienen (Wang y col, 1999), especialmente el ácido rosmarínico que ha mostrado una capacidad antioxidante similar al ácido ascórbico (Zupko y col, 2001). Por otra parte, también poseen actividad antioxidante algunos de sus componentes diterpénicos.

Usos de *S. officinalis*

Entre los usos se destacan los siguientes:

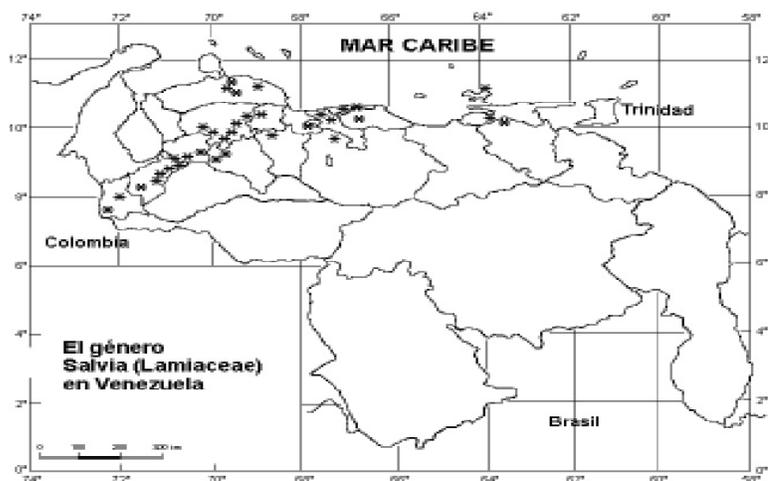
- Antiséptico y antiinflamatorio de la cavidad bucofaríngea (gingivitis, estomatitis, faringitis) en forma de gargarismos.

- Tratamiento sintomático de trastornos digestivos (flatulencia, dispepsias) en infusión.
- Antidiaforético (antihidrótico), en la sudoración nocturna excesiva (tuberculosos) e hipersudoración psicósomática.

Distribución geográfica

De acuerdo con Pineda (2011), esta especie es nativa de la región mediterránea, aunque se ha naturalizado en muchos lugares del mundo. Se encuentra en la Europa mediterránea, en sitios rocosos y herbazales secos, desde el nivel del mar hasta zonas montañosas. Tiene preferencia por los terrenos poco productivos y poco fértiles. En Latinoamérica se encuentra en Suramérica principalmente. En Venezuela, *S. officinalis* se localiza en la región occidental del país, abarcando estados de la región andina como Táchira, Mérida y Trujillo, también en los estados Lara, Yaracuy, Falcón, Cojedes, Portuguesa, Guárico, Aragua, Miranda, Distrito Capital, Sucre, Cumaná y Nueva Esparta (Fig. 6).

Figura 6. Localización geográfica de *S. officinalis*.



Fuente: Pineda, 2011.

Toxicidad y efectos adversos

La administración prolongada del aceite esencial y del extracto alcohólico puede originar convulsiones epileptiformes. El aceite esencial de *Salvia officinalis* es neurotóxico y puede provocar crisis convulsivas precedidas por vómitos e interrumpidas por episodios de obnubilación, hiporreflexia e hipotonía. En ratas induce convulsiones a la dosis de 0,5 g/kg por vía intraperitoneal y llega a ser letal a 3,2 g/kg. Las DL₅₀ estimadas para el aceite esencial son 2,6 g/kg por vía oral en ratas y 5 g/kg vía intradérmica en conejos (Newall, 1996).

Esta toxicidad, debida principalmente a la presencia de monoterpenos oxigenados (tuyonas o en menor medida al alcanfor), se relaciona con una inhibición del metabolismo oxidativo de las neuronas y/o modulador del canal de cloro asociado al receptor GABA A y presenta una sintomatología similar al antagonista picrotoxinina (Hold y col, 2000).

Por este motivo, la legislación comunitaria indica que las cantidades de estas tuyonas en los alimentos (al emplear aditivos aromatizantes) no deben sobrepasar 0,5 mg/Kg en alimentos y bebidas y 5 mg/Kg en bebidas alcohólicas. Como se ha comentado, la composición de este aceite esencial varía estacionalmente. El porcentaje de alcanfor y tuyonas convulsivantes es mayor en invierno, por lo que conviene emplear plantas recolectadas durante la primavera. Esta planta medicinal nunca se debe utilizar durante períodos largos de tiempo y siempre se deben emplear productos estandarizados con cantidades controladas de principios activos. El aceite esencial y los extractos alcohólicos no deben utilizarse durante el embarazo ni en madres en período de lactancia, ya que algunos constituyentes del aceite esencial son potencialmente tóxicos y además la salvia es antigalactógena (Santos y col, 2001).

Actividad antibacteriana de *Salvia officinalis* L.

Se ha reportado actividad inhibitoria *in vitro* del aceite esencial frente a gérmenes Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozanae*, *Shigella sonnei* y *Salmonella* spp.), Gram positivos (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*) y hongos (*Torulopsis glabrata* y *Cryptococcus neoformans*). En cambio, no se ha reportado actividad inhibitoria del aceite esencial frente a *Pseudomonas aureginosa* ni sobre *Staphylococcus aureus*. Sobre *Candida albicans* los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios (Alonso, 2004).

El autor afirma que los extractos de *Salvia* también demostraron su eficacia frente a la acción colagenolítica de *Porphyromonas gingivalis*, agente productor de periodontopatías.

Los extractos de las hojas de *S. officinalis* L., a diferencia del aceite esencial, ha demostrado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. La actividad antimicrobiana estaría dada fundamentalmente por el contenido de tuyonas del aceite esencial y en menor medida por otros componentes del aceite como ser pineol, alcanfor, 1,8-cineol, borneol, cariofileno y su principio amargo picrosalvina. Nuevas investigaciones dan cuenta de la importancia del ácido rosmarínico en la actividad antimicrobiana (Alonso, 2004).

El autor continúa afirmando que respecto a otras partes de la planta, el extracto éter de la raíz de *Salvia officinalis* demostró actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, siendo responsables de dicha actividad los componentes diterpeno-quinónicos conocidos como royleanonas. Por su parte, el extracto acuoso de las hojas ha demostrado actividad antiherpética (HSV-2) con inhibición del efecto citopático en cultivo de células HeLa.

El extracto etanólico demostró inactividad frente a HSV-1, en cultivos de células Vero. La fracción diterpénica es responsable del efecto antiviral. Por último, el extracto acuoso demostró actividad insecticida y repelente (por

la presencia de tuyonas) frente a *Pieris brusson*, *Pieris napi* y *Pieris rapae*. (Alonso, 2004)

Metabolitos secundarios

Un aspecto metabólico que distingue el reino animal del vegetal es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias que no son esenciales para su supervivencia. A esas sustancias se les denomina metabolitos secundarios. Los animales superiores raramente los producen, si acaso pueden ser encontrados ocasionalmente en insectos y otros invertebrados (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas, que son productos del metabolismo secundario y que cumplen funciones no esenciales en ellas; de forma que su ausencia no es un punto importante en el crecimiento vegetal, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género, a una familia, o incluso a algunas especies (Bruneton, 2001). Una de las principales diferencias que presentan los metabolitos secundarios en relación a los primarios es su distribución limitada en el reino vegetal; mientras que los compuestos primarios se encuentran en todo el reino y las diferencias entre especies solo son de índole cuantitativa (Ramos, Frutos, Giráldes, y Mantecón, 1998).

Los vegetales, además de metabolitos primarios, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas, citocromos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, también producen metabolitos secundarios; es decir, sustancias que no parecen participar directamente en el crecimiento o desarrollo, y que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que

simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno (Valle, 2008).

El término secundario implicaba, al principio de las investigaciones; que estas sustancias tenían una menor importancia y muchas veces se les atribuyó la propiedad de productos de desecho del metabolismo primario. Esta idea ha sido gradualmente cambiada, ya que los compuestos secundarios desempeñan un papel protagónico en la fisiología de la planta, la regulación del crecimiento, su desarrollo y la interacción con otros organismos (Raskin, 1992).

A partir de 1960 se han realizado investigaciones que han hecho evidente la importante función ecológica de muchos de ellos. Cada tipo de compuesto secundario está estrechamente relacionado con una o varias funciones específicas en la planta que lo contiene. Son innumerables los reportes que describen el papel que desempeñan estos compuestos en el reino vegetal, aunque hasta la fecha, en la mayoría de ellos, no se conoce con exactitud cada función particular (Valdés y Balbín, 2000).

Clasificación de los Metabolitos Secundarios

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a su estructura, a su bioformación o biosíntesis y a la fuente de producción o a su acción biológica. Aunque ninguna de estas clasificaciones es exclusiva ni excluyente, pues un metabolito puede ser ubicado dentro de varios grupos. Aparentemente la forma más acertada de clasificación corresponde a las vías químicas, por las cuales un organismo los elabora dentro de lo que se denomina ruta biogénica o biosíntesis. En relación al criterio biosintético, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados de forma general en alcaloides, terpenos y terpenoides, compuestos fenólicos, aceites esenciales y compuestos nitrogenados, todos ellos, fabricados a

partir del dióxido de carbono como fuente de carbono(Guarnizo y Martinez, 2000).

Alcaloides

Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores. Son sustancias nitrogenadas, producidas por las plantas como metabolitos secundarios y que presentan una acción fisiológica importante sobre los animales y los humanos aún en bajas dosis. De ahí, que muchas plantas que contienen estas sustancias han sido utilizadas por centenares de años como venenos. No obstante, pese a su efecto tóxico, muchos alcaloides presentan invaluable propiedades farmacéuticas. (Bruneton, 2001).

En las lamiaceas, se han aislado alcaloides en su tamizaje fitoquímico, esto, para dar respuesta a los múltiples usos en el campo terapéutico, ya que son compuestos fisiológicamente activos y por supuesto de gran interés en la industria farmacéutica (Sharapin, 2000).

Terpenos

Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran los carotenos y los glicósidos cardiotónicos. Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glicósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacéutica. Por otra parte, los glicósidos cianogénicos, se consideran posiblemente; los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Pérez y Jiménez, 2011).

Triterpenos y esteroides

Son compuestos de C₃₀, procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura simple policíclica, normalmente tetra- o pentacíclica. Casi siempre hidroxilados en 3 presentan, al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte, siendo excepcionales las modificaciones profundas del esqueleto básico (cuasinoides) (Bruneton, 2001).

El autor afirma que no existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo, tres metilos. El interés terapéutico e industrial de los triterpenos y de los esteroides como grupo de metabolitos secundarios de primera importancia es el siguiente:

- Interés de los glucósidos cardiotónicos, los cuales no se han podido todavía sustituir por ningún producto sintético.
- Interés de las sapogeninas espiroestánicas, sitosterol, estigmasterol, que son materias primas difícilmente reemplazadas para cubrir las necesidades de la industria farmacéutica en hormonas esteroideas.
- Interés terapéutico de numerosas drogas con saponósidos.
- Importancia económica del regaliz, edulcorante no azucarado y aromatizante
- Posible interés de los cuasinoides antitumorales.

Saponinas

Las saponinas (del latín sapo, "jabón") son glucósidos de esteroidales o de triterpenoidales, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Las saponinas son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos

con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea. Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, como por ejemplo la yuca, el ginseng, la quinua, el *Tribulus terrestris* o el quillay, entre otros (Bruneton, 2001).

Sin embargo, el autor indica que estas sustancias presentan una serie de características, tales como no ser nutritivas, además de ofrecer protección frente a agentes externos. Son nutrientes no esenciales, lo que significa que no son requeridos por el cuerpo humano para mantener la vida. Es bien sabido que las plantas producen estos productos químicos para protegerse a sí mismos, pero investigaciones recientes demuestran que también pueden proteger a los humanos contra las enfermedades, efecto antimicrobiótico y propiedades antibacterianas, e incluso estos principios activos son utilizados por la industria farmacéutica (Bruneton, 2001).

El sistema espiroacetal (los anillos E y F) son una característica de los sistemas esteroidales, y es variable el número de insaturación, hidroxilos, grupos cetónicos y otros compuestos oxigenados. Las agliconas triterpenoides están bien representadas por el ácido queretaroico. El enlace glicosídico siempre se forma con el oxígeno del carbono 3. Se conocen más de 200 saponinas esteroidales, localizadas principalmente en las cotiledóneas como liliáceas, amarilidáceas y dioscoreáceas, con excepción de las escrofulariáceas. Otras saponinas triterpenoidales se han aislado principalmente en dicotiledóneas (Marcano y Hasegawa, 1991).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, siendo uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas. Los fenoles son sintetizados por las plantas y son regulados genéticamente, tanto

a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (por ejemplo, los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Gimeno, 2004).

Existen diversas formas de clasificación de estos compuestos. Una de las formas más comúnmente utilizadas se basa en el número de carbonos que los conforman. Los compuestos fenólicos también pueden ser clasificados en función del número de grupos fenoles que poseen. En este sentido, se les denomina fenoles simples o monofenoles (si poseen solamente un grupo fenol), o di- (bi), tri- y oligofenoles si poseen dos, tres o más grupos fenoles, respectivamente. Sin embargo, es posible clasificar estos compuestos desde otra perspectiva, que los divide en dos grandes grupos: No flavonoides y Flavonoides.

- No flavonoides: Ácidos fenólicos (Serie benzoica y Serie cinámica), Estilbenos y Taninos hidrolizables
- Flavonoides: Flavonoles, Flavanoles, Antocianinas, Flavonas, Isoflavonas y Flavanonas

Los compuestos fenólicos más estudiados son los flavonoides. Entre estos compuestos destacan flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. Durante los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre las propiedades beneficiosas de estos compuestos sobre la salud, especialmente de los compuestos flavan-3-oles (también llamados catequinas) (Harborne, 1980).

Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos

compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otros (Pérez y Jiménez, 2011).

Flavonoides

Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos naturales que tiene como estructura básica común dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo heterocíclico pirano y pirona. Los flavonoides se encuentran de manera general en todas las familias de la plantas, sin embargo, hay ciertas estructuras de flavonoides que puede encontrarse de manera frecuente en una determinada familia y no en otra, de ahí que en ciertos casos han sido importantes para un criterio taxonómico aceptable (Abdala, 2000). Estos compuestos han sido aislados de diferentes partes de la planta pero principalmente del pigmento de las flores donde cubren ciertos roles importantes (Harborne, 1977).

Los flavonoides están divididos en diferentes categorías tales como: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas, y auronas. (Gidda y Varin, 2006). Muchos flavonoides han mostrado diversas actividades biológicas tanto *in vivo* como *in vitro* (Shirley, 1996).

Cumarinas

Las cumarinas toman su denominación de “coumarou” nombre vernáculo del “haba tonca”, de la cual se aisló, en 1820, la cumarina. Las cumarinas son venzo (b) 2-piranonas o, sin prejuizar mecanismos biosintéticos, las lactonas de los ácidos orto hidroxí (Z)-cinámicos, sus estructuras son muy variables: se conocen más de 800 en los vegetales superiores. De ellas, las más sencillas, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal, si bien, determinadas familias contienen gran variedad de cumarinas: leguminosas, Compuestas y sobre todo en

Umbelíferas y Rutáceas en las cuales se encuentran las estructuras más complejas (Bruneton, 2001).

La estructura química de las cumarinas se basa en que ellas se encuentran sustituidas en 7 por un hidróxilo. Esta sustitución en el anillo bencénico por hidróxilos, puede ser doble (6 y 7) o incluso triple. (6,7 y 8). Las cumarinas simples corresponden a estos compuestos hidroxilados y a sus ésteres; no es raro que uno de los hidroxilos fenólicos esté unido en un enlace heterosídico. Las tres cumarinas más repartidas son umbeliferona, esculetol y escopoletol (Bruneton, 2001).

El interés terapéutico de las cumarinas es limitado: el esculósido se presenta como venotónico y protector vascular y generalmente como factor vitamínico P, aunque este término, para algunos autores, no deba asociarse más que a los derivados del 2-fenil cromano. Los anticoagulantes cumarínicos utilizados en la actualidad, se han sintetizado sobre el modelo del dicumarol, derivado cumarínico responsable de las hemorragias observadas en el ganado que consume forraje a base de meliloto mal conservado (*Melilotus officinalis* L) (Bruneton, 2001).

Quinonas

Entre los productos naturales, las quinonas están ampliamente representadas, bien sea como núcleo principal de una estructura o formando parte de moléculas complejas aromáticas o aromáticas-alifáticas, y, a veces diméricas. Las quinonas constituyen un grupo importante de pigmentos animales y vegetales. El ejemplo más antiguo es la alizarina, una antraquinona usada desde hace de 2000 años, para teñir. Estos compuestos tienen afinidad por las zonas calcáreas y se fijan en ellas. Tomando en cuenta su estructura se puede clasificar en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y quinonas extendidas. Los ejemplos más frecuentes se refieren a estructuras p-quinoides altamente hidroxiladas en cuyo caso

pueden encontrarse en equilibrio varios tautómeros. Hay ejemplos de o-quinonas como lo es el hallocromo, un pigmento rojo que se aísla del gusano utilizado para pescar: *Lumbriconereis impatiens*. Como criterio general, se acepta que la quinonas provenientes de los microorganismos se forman a partir de ácido acético y aquellas de los vegetales superiores los son de ácido shikímico. No hay métodos especiales para el aislamiento de las quinonas. La extracción alcalina es a veces utilizada en el caso de las antraquinonas, que son las más abundantes en los vegetales superiores. Las antraquinonas se pueden diferenciar de las venzo y naftoquinonas por reducción con ditionito de sodio alcalino que origina soluciones rojas para las primeras mientras que para las segundas son incoloras o amarillo pardo. El color de la quinona en solución básica, y el máximo de absorción VIS indican el patrón de oxigenación (Marcano y Hasegawa, 1991).

Extractos de las hojas de *Salvia officinalis* L

Se trata de un género caracterizado por su riqueza en extractos etanólicos y hexanólicos, con una apreciable variabilidad entre las distintas especies (Tsankova y col, 1994). En términos generales, se puede afirmar que el rendimiento de extractos de cada una de las especies del género *Salvia*, así como la composición del mismo, pueden presentar una alta variabilidad, dependiente, en muchos casos de factores medioambientales, tales como, intensidad de luz, régimen hídrico y tipo de y, en el caso de subespecies, de variaciones en el genoma suelo (Skoula y col, 1999).

La variabilidad en el rendimiento de los extractos procedentes del género *Salvia* puede ser considerada como muy significativa, ya que existen especies con un bajo contenido como es el caso de *S. hydrangea* y *S. multicaulis*, cuyo contenido no llega a superar el 0,42% (Ghannadi y col, 1999), mientras que otras como *S. pomífera*, alcanzan valores superiores al 4% (Karousou y col, 1998).

En valores intermedios se encuentran *S. officinalis*, cuyo rendimiento se encuentra entre 1,4–6% (Tsankova y col, 1994); *S. sclarea* con un rendimiento entre 0,04-1,3% (Ronyai y col, 1999) y *S. fruticosa*, cuyo rendimiento oscila entre 0,9% y 2,8% (Skoula y col, 2000).

Esta variabilidad puede referirse también a la composición de los aceites esenciales de las distintas especies de *Salvia* consideradas, puesto que *S. officinalis* y *S. pomífera* presentan como principales componentes a las tuyonas, *S. sclarea* se caracteriza por la abundante presencia de linalol/acetato de linalilo, al tiempo que tanto *S. fruticosa* como *S. multicaulis* poseen un alto contenido en α -pineno/eucaliptol; en el caso de *S. hydrangea*, es el óxido de cariofileno el componente más representativo de su esencia.

Técnicas utilizadas para la preparación de extractos vegetales

Los extractos vegetales se obtienen por un tipo de extracción llamada “sólido-líquido”. Este proceso consta de tres etapas:

- 1) Penetración del disolvente en los tejidos de los vegetales e hinchazón.
- 2) Disolución de las sustancias extraíbles.
- 3) Difusión de las sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal.

En general, se denomina extracción sólido- líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado (en el área de productos naturales, el material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el cual son solubles algunas de las sustancias que componen al sólido. Del proceso se obtiene un sólido, de empobrecida composición, y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él. Los factores más importantes a tener en cuenta en una extracción sólido- líquido son: la elección del disolvente de extracción, el método de contacto y la temperatura a la cual ocurre el proceso (Ortuño, 2006).

Existen varios métodos de extracción sólido –líquido, el método a emplear depende fundamentalmente de los objetivos del estudio de la planta. Si se persigue el aislamiento de sustancias sensibles al calor, deberán emplearse métodos de extracción en frío; si por el contrario no se posee información sobre la naturaleza química de las sustancias que se espera aislar, se debe seleccionar la técnica dependiendo de las observaciones sobre la marcha (Marcano y Hasewaga, 2002).

Cabe mencionar que la extracción de muestras sólidas con disolventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido o lixiviación, es un método muy utilizado en la separación de analitos de muestras sólidas. Los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido pueden dividirse en dos grandes grupos.

1. Métodos que necesitan un aporte de calor, Soxhlet. Soxtec ® System HT y extracción Soxhlet asistida por microondas.

2. Métodos que no requieren un aporte de calor: agitación con ultrasonidos y agitación simple. La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continua siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Además de muchos métodos de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos. (Lamarque, 2008).

Los métodos más comúnmente empleados para preparar extractos vegetales son los siguientes:

Métodos de extracción discontinua

En este tipo de extracción, una sola porción del disolvente entra en contacto con el material vegetal a extraer. La extracción de los principios activos procede hasta la saturación del disolvente, de manera que el proceso culmina en este punto. No se logra una extracción cuantitativa de los principios activos presentes en el material vegetal (Casado, 2012).

- **Infusión**

Una infusión es una solución diluida de los componentes fácilmente solubles de una o varias partes vegetales. Se realiza sumergiendo las partes vegetales, preferiblemente troceadas o molidas, en una cantidad determinada de agua a temperatura de ebullición; se deja reposar normalmente alrededor de 15 minutos, removiendo de vez en cuando, y a continuación se filtra. Las dosis generales son de aproximadamente un gramo de planta por cada diez gramos de agua. Por lo general, los extractos obtenidos mediante este método presentan muy bajas concentraciones de principios activos (Botella, 2003).

- **Decocción**

En este método, las partes vegetales se mantienen en el disolvente (generalmente agua) en ebullición durante 15-30 minutos. Posteriormente se filtra y se recoge el líquido resultante (extracto). Dado que la solubilidad de los principios activos generalmente aumenta con la temperatura, se logra extraer una mayor cantidad de los mismos en comparación con los métodos que se llevan a cabo a temperatura ambiente; sin embargo, presenta la desventaja de afectar sustancias termolábiles (Casado, 2012).

- **Maceración**

Consiste en dejar las partes vegetales sumergidas en un disolvente, a temperatura ambiente, durante un tiempo relativamente largo. Contrario al

caso de la decocción, en este método las sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la solubilidad de los principios es menor a temperaturas más bajas y, así, se extrae una menor cantidad de principios activos en comparación a la que pudiera extraerse a una temperatura superior (Casado, 2012).

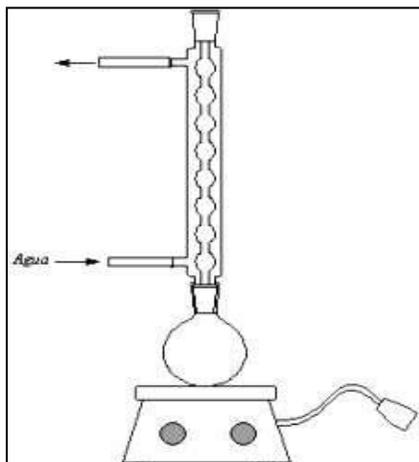
- **Digestión o Extracción por reflujo**

Se trata de una extracción a temperaturas superiores a la ambiente, entre 35 y 40°, e inferiores a los 50°C. Se introducen las partes vegetales a extraer en un recipiente que contiene el líquido previamente calentado a la temperatura deseada; se mantiene durante un período que puede oscilar entre media hora y veinticuatro horas, agitando regularmente el envase. Se separa finalmente el líquido (extracto). Un moderado aumento de la temperatura, eleva un poco la solubilidad de los principios activos sin recurrir a calentamientos extremos (Casado, 2012).

Por otro lado, Sanz (2002) estipula que la técnica consiste en colocar las partes vegetales a extraer en un balón de destilación junto con el disolvente; la boca del balón se ajusta un refrigerante (fig. 7) y se inicia entonces el calentamiento hasta que el disolvente alcanza su temperatura de ebullición. Los vapores generados en el matraz condensan en el refrigerante y caen de nuevo en forma líquida en el matraz. Se mantiene el sistema a reflujo durante algunas (pocas) horas, se deja enfriar el sistema y se separa el líquido resultante.

El reflujo evita la pérdida de disolvente en forma de vapor, de manera que el mismo no llega a agotarse y puede mantenerse el calentamiento durante más tiempo; sin embargo, las sustancias termolábiles resultan considerablemente afectadas (Sanz, 2002).

Figura 7. Equipo de reflujo



Fuente: Sanz, 2002.

Métodos de extracción continua

En este tipo de extracción, el disolvente se renueva una vez que se ha saturado. En ese momento, el disolvente se cambia añadiendo disolvente puro, el cual extraerá más principios activos hasta saturarse. El proceso se repite hasta conseguir extraer la máxima cantidad de principios activos contenidos en el tejido vegetal. En este tipo de métodos, por tanto, se extrae una mayor cantidad de principios activos que la lograda a partir de métodos discontinuos (Casado, 2012).

- **Percolación**

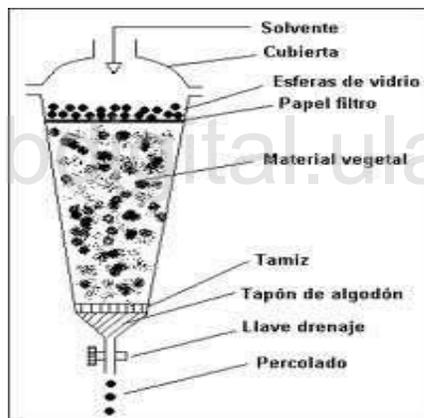
En este método las partes vegetales, finamente picadas o pulverizadas, se colocan en un recipiente en forma de columna (percolador, ver fig. 8) donde también se añade el disolvente (Casado, 2012).

El disolvente recorre, por gravedad, la columna en sentido descendente, entrando en contacto con el tejido vegetal y arrastrando los principios activos que contiene. El percolador presenta en su parte inferior

una apertura controlada por una llave, por donde sale el disolvente con los principios activos disueltos. Por la parte superior se añade disolvente puro, que compensará las salidas inferiores y continuará extrayendo principios activos (Casado, 2012).

Dado que el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente, sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la renovación continua del disolvente constituye una desventaja, ya que el volumen final recolectado es generalmente grande, para lo cual, además, se gastan elevadas cantidades del solvente puro (Casado, 2012).

Figura 8. Percolador



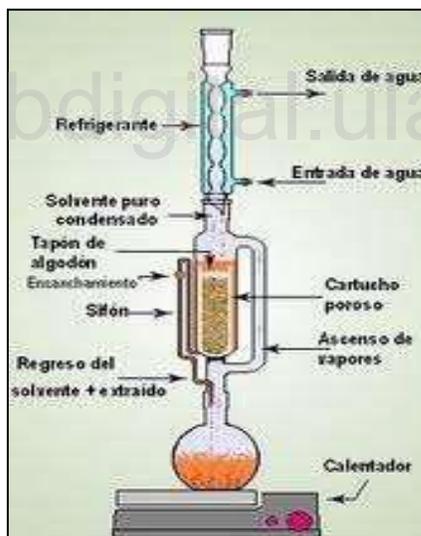
Fuente: Casado, 2012.

✓ **Extracción con Soxhlet**

Consiste en colocar el material a extraer, previamente molido o troceado en una cámara de extracción, la cual se conecta por una parte a un balón de destilación y por otra a un refrigerante (fig. 9). El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material vegetal. Cuando alcanza el nivel conveniente, sifonea por el tubo regresando al balón. El

proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material, a pesar que el calentamiento se lleva a cabo en la parte baja del balón de destilación, el proceso de extracción ocurre a una temperatura superior a la ambiental, con lo cual aumenta la solubilidad de los principios activos; sin embargo, las sustancias termolábiles se ven considerablemente afectadas durante el proceso. La mayor ventaja de este método, la constituye el hecho de poder efectuar la extracción continua sin añadir nuevas cantidades del solvente puro, de manera que el volumen final del extracto obtenido, será igual a la cantidad inicial de solvente colocado en el sistema (Lamarque, 2008).

Figura 9. Equipo Soxhlet.



Fuente: Lamarque, 2008

Bioensayos para el análisis antibacteriano

La potencia de una sustancia antimicrobiana se define como: “la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado” y se basa en la medición de algún atributo del producto, por

ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición) se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos (Martínez, 2005).

La potencia debe ser una propiedad o atributo definible y medible para un producto biológico o semisintético, y debe estar presente en los estudios de estabilidad, con el ánimo de verificar la conformidad del producto en lo que respecta su calidad (Martínez, 2005).

La actividad o potencia de un antibiótico puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia. Si se prueban las muestras en diferentes concentración se puede determinar una concentración mínima inhibitoria del antibiótico hacia ese microorganismo (Mora, 2007).

Metodologías para evaluar la Actividad Antibacteriana

No existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como se establece para antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos utilizados para evaluar actividad de extractos de plantas sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación. Los métodos más comúnmente utilizados en laboratorio por su sencillez y rapidez, son: la técnica de difusión por discos en agar, es utilizada para generar datos cualitativos principalmente, y los métodos de dilución en

medio líquido de cultivo y en agar, ambos métodos nos permiten conocer datos cuantitativos (Shiva, 2007).

Técnica de difusión en placa

Según Rivas y col (2016), la metodología se enmarca en lo siguiente:

- ✓ **Material vegetal:** La planta colectada se debe secar en la sombra a temperatura ambiente, posteriormente la planta seca es triturada para llevar a cabo el proceso de extracción.
- ✓ **Microorganismos:** Es importante de establecer si estos provienen de muestras clínicas de paciente o si son cepas de referencia ATCC con la finalidad de conocer las condiciones físico-químicas específicas de cada uno de los microorganismos en estudio y que estos no sean factores que influyan de manera negativa en el procedimiento.
- ✓ **Medio de cultivo:** Cuando las cepas se encuentran liofilizadas se cultivan en caldo para posteriormente preservarse en agar inclinado en tubo (bacterias). El tipo de agar para el tubo inclinado dependerá del tipo de microorganismo, aunque los medios más recomendados son infusión cerebro y corazón (ICC), agar soya tripticasa (TSA), agar Mueller Hinton (MH) o agar nutritivo. En el caso de hongos y levaduras, se recomienda agar Saboreaud-Dextrosa. Las temperaturas de incubación, varían dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para la mayoría de las bacterias mientras que para hongos y levaduras la temperatura recomendada es de $29 \pm 2^\circ\text{C}$. El tiempo de incubación puede variar de 24-48 h, mientras que para el crecimiento de hongos se recomiendan de 5 a 7 días. Para las pruebas de actividad antimicrobiana se deben incubar según las condiciones descritas anteriormente aplicando el método de pozo o de disco. Para la técnica de difusión en pozo, algunos medios

son recomendados para microorganismos específicos, tal es el caso del agar Baird-Parker para el cultivo de *Staphylococcus aureus*; el agar McConkey para *Escherichia coli*; agar sangre para *Streptococcus* β hemolítico y agar Saboreaud Dextrosa para *Saccharomyces cerevisiae*; para el método de disco se emplea cotidianamente Muller Hinton a excepción de las levaduras en las que se emplea el medio descrito en el método modificado de pozo en agar.

- ✓ **Preparación del inóculo:** Una vez cultivadas las cepas en el medio inclinado, se toman con el asa inóculos del cultivo colocándose en un tubo con solución salina (0,85 %) se debe ajustar el inóculo a 0,5 unidades (108 cel/mL) según la escala de McFarland y se verifica con la absorbancia a 580 nm cercana al 25 %.

Métodos en agar

Método de difusión por discos

Entre estos métodos el más utilizados por su sencillez y rapidez en la lectura de resultados es el método de difusión por discos, basados en la metodología utilizada por Bauer y col. El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato (usualmente discos de papel) en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio; se formará así, por difusión un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (Ramírez y Castaño, 2009).

El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de

difusión del producto en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria o microorganismos en estudio (Ramírez y Castaño, 2009).

En caso de evaluación de antibióticos el medio más utilizado es el Agar Mueller Hinton, pero en la evaluación de extractos de plantas se utilizan variedad de medios, siendo los más utilizados, el Agar Mueller Hinton, Agar Triptona Soja, Agar Nutritivo, Agar Infusión Cerebro Corazón (Shiva, 2007).

Método modificado de pozos de agar

Se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25 μL de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la caja invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para bacterias y a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (Ríos y col, 1988).

Métodos de dilución

Método de dilución en agar

Otro método de evaluación en agar es el de dilución en agar, en éste método se incorpora el producto a evaluar a un medio con agar. El producto se añade cuando el medio aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de producto. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. Como medio de cultivo se suele

utilizar el Agar Mueller Hinton como en el método de difusión por discos, aunque también se utilizan otros medios como TSA, Agar nutritivo, Agar BH, etc. Los resultados de las pruebas de dilución en agar se expresan como concentración inhibitoria mínima (CIM) (Shiva, 2007).

Métodos en medio de cultivo líquido

La cuantificación de la actividad *in vitro* se realiza habitualmente, mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de la muestra, que se encuentra diluida en el medio de cultivo (caldo). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilita la utilización del método de microdilución en caldo (Shiva, 2007).

Este último método se ha venido usando para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos de plantas, Carson y col, en el año 1995, describen la CIM como la menor concentración que mantiene o reduce la viabilidad del inóculo luego de 24 horas de contacto. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del producto a evaluar en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocular dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo (Shiva, 2007).

Teniendo en cuenta que la mayoría de microplacas tienen 96 pocillos (12x8) se puede aprovechar para ensayar hasta 11 diluciones de un producto, ya que la última columna se suele utilizar para controles de crecimiento microbiano y esterilidad del medio. El medio de cultivo estándar utilizado para la evaluación de antibióticos por el método de dilución en caldo

es el Caldo Mueller Hinton aunque para la evaluación de CIM de extractos de plantas se utilizan caldo nutritivo, Caldo Triptona Soja y en ocasiones añadiendo suplementos como suero (Shiva, 2007).

Método de Mitscher

Existe un método para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana conocida como el Método de Mitscher. La actividad antimicrobiana se cuantifica *in vitro* para determinar la susceptibilidad o la resistencia de un microorganismo determinado a diferentes concentraciones de un extracto. Esta técnica se fundamenta en cultivar las bacterias directamente sobre agar nutritivo mezclado con extracto a diferentes concentraciones y evaluar el grado de inhibición de estos extractos que ocasionan en el desarrollo bacteriano, correlacionando el blanco que está constituido por un crecimiento bacteriano total y el blanco positivo que es el agar nutritivo mezclado con el fármaco de referencia (Argueta y Vasquez, 2009).

El método consiste en colocar diferentes concentraciones del extracto en cápsula de Petri conteniendo agar tripticasa soya, en los cuales se procede a marcar con una línea el sitio donde será rallado cada uno de los microorganismos de prueba y luego con una asa de Henle estéril se toma una asada de la suspensión de cada microorganismo en turno. El asa con el microorganismo entonces es rayada en un patrón radial de cada cápsula de Petri siguiendo una plantilla. Una vez inoculada se incuban y luego se examina cada una de las placas y se determina si hubo o no actividad antimicrobiana por la presencia o no de colonias (Argueta y Vásquez, 2009).

Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar; en este método una cantidad conocida de muestra diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra. Este método es simple y rápido para ensayar la actividad antibacteriana. La

incubación se realizara a 37°C con las cajas hacia abajo para evitar que las gotas de agua condensadas caigan sobre los microorganismos y puedan modificar su crecimiento y se lo realizara por un periodo de 24 y 48 horas (Argueta y Vásquez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

A continuación se describe detalladamente los aspectos metodológicos que se emplearon en el desarrollo de este estudio, referida a evaluar el perfil fitoquímico de las hojas de *Salvia officinalis* L y su actividad antibacteriana.

Tipo y diseño de investigación

Tipo de investigación

La investigación fue analítica de tipo confirmatorio; esta investigación, se dice, es analítica puesto que se analizará el perfil fitoquímico de las hojas de *Salvia officinalis*, es confirmatorio porque establece relaciones causa y efecto para confirmar la veracidad o falsedad de la hipótesis que se maneja en esta investigación (Arias, 2012). Además es de tipo descriptivo, porque controlará las variables que intervienen en el proceso de extracción, para así describir los resultados en la obtención del producto deseado y así posteriormente caracterizarlo.

Diseño de la investigación

La presente investigación se basó en un estudio experimental, ya que la especie vegetal fue sometida a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento, para observar reacciones y por consiguiente confirmar la hipótesis planteada. Asimismo, se analizó cualitativamente los resultados de cada ensayo fitoquímico; y el análisis antimicrobiano fue cuantitativo, puesto que se utilizó la técnica de medición de halos de inhibición en mm en el método de difusión en pozo Kirby-Bauer modificado.

Población y muestra

- **Población:**

En este trabajo, la población estuvo representada por la especie vegetal *Salvia officinalis* L (Lamiaceae).

- **Muestra:**

La muestra que fue sometida a análisis la constituyen las hojas frescas de la especie vegetal *Salvia officinalis* L (Lamiaceae). Éstas fueron recolectadas en la población de Chiguará, del Municipio Sucre del estado Mérida, Venezuela. Las mismas fueron pesadas y se obtuvo una cantidad 647,03 g, lo que representó la muestra en material fresco.

Sistema de variables

Las variables planteadas en este trabajo contribuyeron a la evaluación fitoquímica preliminar y análisis de las hojas de *Salvia officinalis* L. Por consiguiente quedan establecidas de la siguiente manera:

- **Variable independiente:**

Metabolitos secundarios de la especie vegetal *Salvia officinalis* L. Esta se presenta como variable independiente puesto que son los componentes de la especie los que otorgarán la bioactividad a la planta.

- **Variable dependiente:**

Actividad antibacteriana de la especie *S. officinalis* L. Tal propiedad va a depender de los metabolitos secundarios encontrados en la especie estudiada.

Tabla 1. Operacionalización de las variables.

Variable	Tipo de variable	Definición de la variable	Dimensiones	Indicadores
Metabolitos secundarios	Independiente	Son compuestos químicos sintetizados por las plantas, que son productos del metabolismo secundario (Bruneton, 2001)	Triterpenos Flavonoides Cumarinas Quinonas Saponinas Componentes fenólicos	Presencia o ausencia de los metabolitos secundarios
Actividad antibacteriana	Dependiente	Efecto inhibitorio de ciertos componentes frente a un determinado microorganismo (Martínez, 2005)	Bacterias Gram positivas Bacterias Gram negativas	Sensibilidad Resistencia

Fuente: Gutiérrez, 2019.

Hipótesis

Debido a que la planta del género *Salvia* ha sido ampliamente estudiada, con propiedades curativas y de localización cosmopolita, se desea evaluar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la especie *Salvia officinalis* L y de esta manera caracterizarlos con el fin de hacer un estudio fitoquímico preliminar de ella y evaluar su actividad antibacteriana. Es así que se plantea la siguiente hipótesis:

Los estudios reportados muestran que las especies de género *Salvia* biosintetizan metabolitos secundarios como aceite esencial, diterpenos fenólicos, flavonoides, luteolina, entre otros, entonces es de esperar que la *Salvia officinalis* L. resulte ser una fuente de compuestos con estructuras similares a los aislados en otras especies, y, por lo tanto, presente actividad antibacteriana.

Instrumento de Recolección de Datos

Los datos que se obtuvieron del análisis de la hojas de la especie estudiada (*Salvia officinalis* L) y su actividad antibacteriana, se organizaron en tablas en las cuales se depositaron los resultados obtenidos en cada ensayo.

Materiales y equipos

Los materiales usados en este estudio comprenden aquellos necesarios para la extracción y análisis de los metabolitos secundarios así como también, los necesarios para la evaluación de la actividad antibacteriana de la planta. Tales, se encuentran en el laboratorio en el que se desarrolló la investigación. Éstos fueron:

- Balanza analítica digital.
- Estufa.
- Mortero.
- Equipo reflujo.
- Tubos de ensayo.
- Embudo.
- Matraz de Erlenmeyer.
- Rotavapor.
- Ultrasonic.
- Placas de Petri
- Agar Mueller-Hinton
- Pipeta Pasteur
- Hisopo estéril
- Discos antibióticos.

Reactivos:

- Disolventes utilizados: hexano y etanol.
- Reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff.
- Diclorometano
- Ácido clorhídrico
- Cloruro férrico
- Hidróxido de amonio concentrado
- Solvente dimetil sulfóxido (DMSO)

Procedimiento experimental

Recolección e identificación de la muestra (Hojas frescas de *S. officinalis* L)

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en la población de Chiguará, del Municipio Sucre del estado Mérida, Venezuela. Esta muestra estuvo contentiva de 647,03 g de hojas frescas de la especie vegetal. Identificada por los investigadores en el Centro de Investigaciones Herbario (MERF) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Preparación del material vegetal

Luego de la recolección del material botánico, se seleccionaron sus partes aéreas (hojas frescas), se separaron y se secó el material fresco. Detalladamente, el proceso fue el siguiente:

- **Limpieza y selección:** La selección se realizó manualmente tomando en cuenta las hojas en buen estado. La limpieza implicó la separación de ramas, pajas, tallos y cualquier otro elemento distinto al deseado.

- **Pesado del material fresco:** el material a utilizar, en este caso, las hojas frescas de la especie *Salvia officinalis* L fue una cantidad de 647,03 g, cantidad necesaria para poder evaluar los metabolitos secundarios de la planta.
- **Secado:** Se secó el material fresco (hojas), dejándolo 7 días en la estufa a una temperatura de 40 °C.
- **Molienda:** Luego de que el material se retiró de la estufa verificando previamente que estuviera bien seco se procedió a la molienda de las hojas secas empleando un mortero de porcelana hasta que dicho material seco quedara totalmente triturado, con la finalidad de reducir el tamaño de partícula y facilitar el drenaje del extracto durante la extracción y determinación de los otros metabolitos a analizar.
- **Pesado del material seco y molido:** Luego del secado y triturado del material, se volvió a pesar el resultado obtenido en las etapas mencionadas, obteniendo un peso del material seco correspondiente a 140,26 g.

Obtención del extracto de las hojas de Salvia officinalis L

Para efectos de esta investigación, se seleccionó una muestra de hojas frescas previamente separadas. Secadas, molidas y pesadas, de *Salvia officinalis*, para la obtención del extracto con disolventes orgánicos.

Según Marcano (2002), en el proceso de obtención de los extractos en una especie vegetal es necesario romper las células vegetales, que contienen metabolitos secundarios y así lograr un mayor rendimiento en la obtención de tales extractos. Es por ello, que para lograr el objetivo de extracción, las partes aéreas del material vegetal, las hojas de *S. officinalis* (140,26 g) fueron tratadas mediante el uso de un método de extracción rápido, en el cual se usa menos cantidad de reactivo y se puede obtener la muestra, en este caso el extracto, en un menor tiempo; por ello, se usó el

método de extracción discontinuo, también llamado digestión o reflujo, usando como disolventes el hexano y etanol.

- En este procedimiento, la muestra sólida fue pulverizada y colocada en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet.
- Se calentó el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensaron sus vapores que cayeron, gota a gota, sobre el cartucho que contenía la muestra, extrayéndose los analitos solubles.
- Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanzó la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, ascendió por el sifón y retornaron al matraz de ebullición.
- Este proceso se repitió hasta que se completó la extracción de los analitos de la muestra y se concentraron en el disolvente.
- Luego de realizar las dos extracciones tanto con hexano como con etanol, se filtraron ambos extractos utilizando papel de filtro un embudo y un Matraz de Erlenmeyer.
- Seguidamente los extractos se incorporaron al rotavapor a una velocidad media y una temperatura de 60 grados centígrados, haciendo vacío para lograr una mayor concentración de los extractos.
- Finalmente se recogieron los extractos en envases rotulados, se taparon con papel aluminio para que se evaporaran los disolventes guardados en la estufa, se dejaron 1 mes y se obtuvieron los extractos de *S. officinalis*.

Determinación del perfil fitoquímico de *Salvia officinalis* L

La evaluación fitoquímica preliminar se realizó aplicando un conjunto de pruebas cualitativas para conocer los principales grupos de compuestos presentes, en este caso, en las hojas de la planta de interés que poseen los extractos obtenidos de las extracciones previas.

Reconocimiento de Alcaloides

En este ensayo se utilizaron los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff. Se tomó una porción del aceite obtenido con extracto etanólico, se le adiciono ácido clorhídrico (HCl) al 5%, se calentó en baño de María y se esperó a que tomara temperatura ambiente (enfriamiento), esto para que se liberen las sales presentes en los alcaloides; luego se tomaron tres tubos de ensayo debidamente identificados con cada reactivo, se adiciono cierta cantidad de muestra en cada tubo junto con los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff hasta la aparición de turbidez o precipitado.

Reconocimiento de esteroides y/o triterpenos

Se empleó la reacción de Lieberman Bouchard; se tomaron tubos de ensayo debidamente rotulados, identificando los extractos obtenidos con cada solvente, etanol y hexano llevados a sequedad, se agregó diclorometano a todos los tubos de ensayo se llevó al ultrasonic para que se disolviera la muestra, luego se agregó anhídrido acético a cada tubo y por las paredes de cada uno se agregó ácido sulfúrico observando el cambio de color de la reacción, tomando en cuenta el color rojo positivo para triterpenos y el color verde positivo para esteroides.

Reconocimiento de componentes fenólicos

A un tubo de ensayo con extracto etanólico se le agregó cloruro férrico, la formación de coloración indica presencia de compuestos fenólicos, el color verde para derivados del catecol y de azul a negro derivado del ácido gálico.

Reconocimiento de flavonoides

La reacción de Shinoda fue la empleada en este ensayo, agregando ácido clorhídrico y virutas de magnesio (Mg) al tubo de ensayo con cada extracto obtenido de los solventes etanólico y hexanico, para luego ser observado el viraje de color.

Reconocimiento de quinonas/ antraquinonas

Se empleó el hidróxido de amonio concentrado al extracto, previa muestra en los tubos de ensayo, identificados con el extracto obtenido de cada solvente etanólico y hexanico y se observó si había o no el viraje de color rojo, lo que indica positivo para antraquinonas.

Reconocimiento de cumarinas

Se usó la reacción con hidróxido de amonio concentrado, se agregaron a cada muestra del extracto, gotas de disolvente etanol y hexano, luego se agregó el hidróxido de amonio concentrado, la presencia de fluorescencia bajo las luz UV indicaría la positividad de la prueba.

Reconocimiento de saponinas

Se basó en la prueba de altura y estabilidad de espuma, tomando un tubo de ensayo con muestra del extracto etanólico, se agitó vigorosamente

para ver la presencia de espuma y tamaño indicando la positividad de lo contrario si no se forma espuma es negativo.

Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Salvia officinalis* L

Microorganismos

Cepas: Para la evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en pozo, se utilizaron cinco microorganismos; dos especies de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y tres de ellas Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23357) de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC); merece importante mención que estas cepas fueron donadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. En concordancia con Lizcano y Vergara, 2008, tales microorganismos fueron seleccionados bajos los siguientes criterios:

- Representan diferentes grupos (Gram positivos y Gram negativos)
- Son agentes patógenos para humanos, por su relación con los diferentes cuadros clínicos que causan.
- Crean resistencia a antibióticos con facilidad.
- Son cepas certificadas por la ATCC

Preparación de las placas

Para la preparación de los medios de cultivo, en este caso, se usaron 20 mL del Agar Müller Hinton previamente preparado y esterilizado en autoclave, posteriormente se dejó solidificando a temperatura ambiente en

un sitio estéril. Tal esterilidad la dió el uso de mecheros de Bunsen, puesto que el trabajo se realizó en el área de esterilidad que concede el mechero encendido.

Aislamiento de las cepas

Se realizó la siembra de los microorganismos en Agar Müeller Hinton que fueron incubados a 37°C, en estufa, por 18 a 24 horas, tiempo prudencial para que las bacterias adquieran los nutrientes necesarios para su crecimiento, posteriormente a esta incubación se sembró cada microorganismo en el medio selectivo, una placa para cada cepa. Luego que se tuvieron las colonias aisladas y purificadas, se realizó la determinación de las características macroscópicas y microscópicas de para cada microorganismo realizando la coloración de Gram.

Prueba de susceptibilidad antibacteriana

Se utilizó la técnica de difusión en pozo en Agar de Kirby-Bauer modificado, para esto se hizo uso del Agar Müller Hinton, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de distintos microorganismos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas con potencial antimicrobiano (Chambers, 2003).

Técnica de difusión en pozo en Agar (Kirby-Bauer) modificado

Luego de aislar las colonias, y tenerlas puras en sus respectivos medios, se preparó el inóculo bacteriano en un tubo contentivo de solución salina a 0,85 %, se ajustó las concentraciones mediante la comparación con el tubo 0,5 Mc Farland, hasta alcanzar la turbidez semejante a éste. Esto se hace mediante la inoculación de colonias aisladas de las cepas bacterianas, equivalentes a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Cada inóculo bacteriano se extendió con un hisopo estéril debidamente humedecido en forma homogénea en las placas

que contiene agar Müller Hinton, girando la placa hasta lograr cubrir toda la superficie. Luego se procedió a perforar la superficie del agar con el reverso de una pipeta Pasteur, con el fin de formar los pozos de 6 mm de diámetro. Seguido, se depositó 10 uL (concentración 500 ppm) del extracto concentrado, así como también los estándares (Controles positivos y negativos), para ello, se usaron antibióticos como Eritromicina (15 uL), Ampicilina (10uL) y Piperacilina (10uL); y 10uL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO) como control negativo para verificar que el halo de inhibición es provocado por el extracto y no por el solvente.

Luego del depósito de los controles positivos, control negativo y extracto concentrado en el Agar Müller Hinton, se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos (Preincubación), pasado los 30 minutos se incubó 37°C por 24 horas, en posición invertida, en atmósfera aeróbica (Araque y col, 2007)

www.bdigital.ula.ve

Lectura de los halos de inhibición

A las 24 horas de incubación, se revisaron las placas y se midieron con una regla milimetrada la zona clara alrededor de los pozos y de esta manera encontrar los resultados que se persiguen con este estudio. Es decir, determinar si existe actividad antibacteriana en el extracto de la especie *Salvia officinalis* L.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El presente capítulo muestra los resultados obtenidos del estudio fitoquímico preliminar y análisis de la actividad antibacteriana los extractos de las hojas de *Salvia officinalis* L, además, describe las deducciones de la investigación, su debida interpretación y posterior análisis. Cabe mencionar que la muestra usada inicialmente fue de 647,03 g de las hojas frescas de la especie vegetal, quedando un peso final de 140,26 g, luego del secado en estufa.

Los resultados se presentan en tablas para una mejor comprensión, en el caso de los extractos obtenidos se muestran las ecuaciones usadas para el cálculo de porcentaje de rendimiento, y en el caso de los metabolitos se identifica el analito, reactivos empleados y resultado cualitativo, basado en la positividad o negatividad de la prueba, lo que indica la presencia o ausencia del metabolito secundario. Con referencia a la actividad antibacteriana, los resultados se expresan tomando en cuenta la sensibilidad o resistencia de las bacterias, dado por la medición del halo de inhibición; quedando establecidos de la manera siguiente:

Resultados obtenidos de la obtención de los extractos de *Salvia officinalis* L

Luego de la obtención de los extractos, usando etanol y hexano se procedió al pesado de cada porción, arrojando los resultados a continuación:

- Extracto con disolvente Etanol: peso del extracto obtenido: 8,3 g.
- Extracto con disolvente hexano: peso del extracto obtenido: 2,4 g.

Tal como lo afirma Ortega y co(2002), una cantidad superior a 1,5 g del extracto debe ser considerada como óptima para el análisis de la muestra, es

por ello, que ese momento de la investigación, la misma se encontraba en la dirección deseada, puesto que se logró obtener la cantidad suficiente para la evaluación, fue necesario calcular el porcentaje de rendimiento de la misma, ya que según Martínez y col (2014), el porcentaje de rendimiento varía de acuerdo con el tratamiento de la planta, es decir, que de acuerdo con su origen, los extractos naturales, artificiales y sintéticos difieren en el porcentaje de rendimiento, en este caso, con base en lo estipulado por los autores, por tratarse de un extracto de origen natural el rendimiento normalmente será bajo.

Por ello, se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto obtenido de la planta en estudio, resultando lo siguiente (Tabla 2).

Etanol: 140,26 g material seco	_____	100%
8,3 g extracto	_____	x= 5,91 %
Hexano: 140,26 g material seco	_____	100%
2,4 g extracto	_____	x= 1,71 %

Estos resultados confirman lo mencionado por Martínez y col (2014), ya que estipula que los extractos de origen sintéticos sobrepasan un porcentaje del 12%, en este caso, las especies del género *Salvia*, poseen porcentaje de rendimiento bajo e intermedios; esto se sujeta en que el rendimiento en extracto de *S. officinalis*, se encuentra entre 1,4 – 6% (Tsankova y col, 1994). Lo que confirma el resultado obtenido en este estudio, cuyos resultados fueron entre 1,7% y 5,9%. Es así, que los resultados relacionados con el porcentaje de rendimiento del extracto quedan establecidos así:

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento del extracto de *S. officinalis*

Extracto de <i>Salvia officinalis</i> L	Disolvente Etanol. Porción etanólica		Disolvente Hexano. Porción hexánica
Porcentaje de rendimiento	5,91%		1,71%

Resultados obtenidos de la identificación de metabolitos secundarios de *S. officinalis* L

El reconocimiento de alcaloides obtuvo resultados positivos. En concordancia con las teorías usadas en esta investigación, Bruneton (2001) afirma que los alcaloides, como sustancias orgánicas están presente en las plantas como metabolitos secundarios, lo que apoya el resultado al obtener positividad en las diferentes reacciones, además estudios como el de Sierra y col (2011) apoyan esta teoría, al analizar otras especies de *Salvia* como *S. coccinea* de la que se extrajo este importante metabolito. Además, los autores mencionados también sugieren, que en gran parte, este metabolito es de interés farmacológico, por lo que regularmente es estudiado en plantas como la *Salvia*, que, como es sabido, se ha usado desde tiempos remotos como recurso terapéutico, y en gran medida, este resultado confirma que los alcaloides podrían ser unos de los compuestos más importantes en la *S. officinalis* otorgándole propiedades curativas.

Por otro lado, la especie *S. officinalis* arrojó resultado positivo para la presencia de esteroides y negativo para triterpenos, que aunque hay estudios en los que se logró aislar ambos metabolitos, se presume, por la literatura que no todas las especies del género *Salvia* poseen los componentes similares, por ejemplo, Sierra y col (2011) en su estudio lograron detectar triterpenos, pero su especie en estudio fue *S. coccinea*; por otro lado, López

y col (2010) con *S. amarissima* alcanzó el logro en esteroides mas no en triterpenos, y solo obtuvo el éxito en extractos metanólicos y no en hexano, lo que explicaría en cierta manera la ausencia de triterpenos en este caso, ya que se usó fue extracto etanólico y no metanólico.

El resultado de los componentes fenólicos, aunque tardó en mostrar su positividad, y en un primer momento se pensó que sería negativo, se pudo observar el viraje de color, lo que dejó en evidencia la presencia de este importante metabolito en la planta, y por supuesto, atendiendo a autores como Martínez y col (2014) cuando afirma que la presencia de compuestos fenólicos se debe a la presencia de catecol y ácido gálico en las especies del género *Salvia*. Además los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, por lo que era de esperarse la presencia de este metabolito en la planta, siendo uno de los principales metabolitos secundarios en ellas, aunque ciertos factores ambientales pudieran interferir en su aparición. (Gimeno, 2004). Es así que, este resultado viene a verificar la información otorgada por otros investigadores, quienes también han aislado compuestos fenólicos de la especie *S. officinalis*

Entre los compuestos fenólicos más estudiados en las plantas de género *Salvia* se tienen los flavonoides, esto viene a confirmar la positividad del ensayo anterior. Ya que al tener resultado positivo en flavonoides, para los compuestos fenólicos el resultado sería similar; aunque en la prueba de la cual esta precede, el resultado tardó en mostrar su positividad, pudo deberse a que en algunos casos, no es positivo para ciertos compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. (Pérez Alonso y Jiménez, 2011); pero en lo que a flavonoides se refiere, sí resultó positivo, lo que se apoya en la teoría dada por López y col (2010) y Ortega y col (2002) cuando afirman que el género *Salvia* es uno de los géneros en los que se ha aislado flavonoides.

Con respecto a las quinonas y antraquinonas el resultado negativo para *S. officinalis* era de esperarse, puesto que los estudios que se usaron como referentes para esta investigación coinciden con este resultado. Es por eso que Marcano y Hasegawa (2001) merecen atención cuando afirman que este tipo de producto natural, las quinonas, se originan, en vegetales superiores del ácido shikímico; en esta teoría se fundamenta Ortega (2002), cuando dice que la estructura química de la *S. officinalis* está compuesta principalmente por ácidos fenólicos, y el ácido shikímico aún no ha sido reportado en la familia lamiaceae, es entonces, cuando se asume que las quinonas son ajenas a este género (*Salvia*), dado que en la totalidad de estudios revisados en esta investigación, las quinonas son reportadas como negativas.

Con relación a las cumarinas, el resultado fue negativo, este resultado no expresa la usencia de las cumarinas en la especie estudiada, sólo que la prueba con hidróxido de amonio concentrado puede considerarse como inespecífica para las cumarinas. Se reportan resultados positivos para este tipo de compuesto fenólico, como es el caso de Padilla (2015), quien usó las pruebas Kedde y Bajlet pudiendo reportar la presencia de este metabolito en *S. officinalis*

Del mismo modo, las saponinas se reportan negativas puesto que la cantidad de espuma y altura, al agitar la muestra, no fue suficiente para dar un reporte positivo sobre ella, por tal razón se puede concluir que, referente a las saponinas, la *S. officinalis* sí las presenta, puesto que varios estudios como el de Padilla (2015) fueron reportadas positivas débiles, porque la altura y cantidad de espuma logró observarse pero marcando sólo una cruz (en el caso de la investigación de Padilla, 2015). También Lu y Foo (2000) reportaron la presencia de saponinas en muestras de *S. officinalis* también en pequeñas cantidades, lo que certifica que en efecto, la especie la

contiene, pero con escasa presencia. A continuación se muestra, en conjunto, los metabolitos estudiados y sus resultados:

Tabla 3. Resultados del tamizaje Fitoquímico para la *Salvia officinalis*.

Principios activos	Nombre de la reacción	Indicador/coloración/Aspecto	EESO	EHSO	Resultados
Investigación de Alcaloides	Mayer	Precipitado Blanco	✓	✓	+
	Dragendorff	Precipitado Rojo Ladrillo	✓	✓	+
	Wagner	Precipitado Café	✓		+
Investigación de Triterpenos/esteroides	Lieberman Bouchard	Color rojo (triptenos)	✓	✓	-
		Color verde (esteroides)	✓	✓	+
Investigación de Componentes fenólicos	Tricloruro férrico	Color Verde/Color azul	✓	✓	+
Investigación de Flavonoides	Shinoda	Color rojo	✓	✓	+
Investigación de Quinonas/Antraquinonas	Hidróxido de amonio concentrado	Color rojo	✓	✓	-
Investigación de Cumarinas	Hidróxido de amonio concentrado	Fluorescencia	✓	✓	-
Investigación de Saponinas	Prueba de altura y estabilidad de espuma	Presencia de espuma y altura.	✓	✓	-

Legenda: EESO: Extracto Etanólico de *Salvia officinalis*. EHSO: Extracto hexánico de *Salvia officinalis*

Fuente: Gutiérrez, 2019

Mediante la marcha fitoquímica preliminar aplicada a la *Salvia officinalis* L se obtuvo los resultados esperados destacándose como marcadores químicos de la muestra vegetal la presencia abundante de flavonoides, esteroides, alcaloides, y componentes fenólicos, y la ausencia de triptenoides, quinonas, cumarinas y saponinas.

Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de las hojas de *Salvia officinalis* L

La siguiente tabla (Tabla 4) expresa los resultados referidos a la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de la especie estudiada contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas; cabe recordar que estos microorganismos son morfológicamente y fisiológicamente diferentes (Calvo y Martínez, 2009). En tal sentido, la muestra ensayada fue inactiva casi en su totalidad, a excepción de un microorganismo Grampositivo y otro Gramnegativo, contra los cuales, arrojó una débil sensibilidad. Esto se apoya en teorías que seguidamente se explican.

Tabla 4. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *S. officinalis* L

Microorganismo (Bacterias Grampositivas y Gramnegativas)	Zona de inhibición mm				Extracto <i>S. officinalis</i>	SUSCEPTIBILIDAD
	Controles					
	Positivo			Negativo		
	ERY	AM	PIP	DMSO		
<i>Staphylococcus aureus</i>	32mm	-	-	0mm	8mm	Sensible
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	32mm	-	0mm	-	Resistente

<i>Escherichia coli</i>	-	-	27mm	0mm	-	Resistente
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	27mm	0mm	-	Resistente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	27mm	0mm	8mm	Sensibl

Leyenda ERY: Eritromicina. AM; Ampicilina PIP: Piperacilina

Fuente: Gutiérrez, 2019.

Partiendo de esta información, es indiscutible que los extractos de las hojas de *Salvia officinalis* L no presentan actividad antibacteriana frente a todas las bacterias estudiadas, ya que, como se puede observar, presentó resistencia contra la mayoría de las bacterias, a saber: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, es decir, fueron resistentes frente a la a la concentración evaluada del extracto etanólico del extracto etanólico de *Salvia officinalis* (500ppm). Sin embargo, se encontró una débil sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, razón por la cual se pensaría de un resultado inseguro, puesto que, partiendo del uso del control negativo (DMSO), con halo de referencia de 0mm, el extracto alcanzó un halo de 8mm, por lo que permite afirmar que hubo una diferencia de tan solo 2mm, muy próximo al control negativo, por tal motivo, se dice que se obtuvo una débil sensibilidad; pero apoyándose en la teoría de Alonso (2004), los extractos etanólicos y hexánicos de las hojas de *S. officinalis* L., a diferencia del aceite esencial, han demostrado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, por lo tanto, se reportó sensible ante *S. aureus*. Según el autor, tal sensibilidad está dada por la presencia de dipertenos, tripertenos y quinonas en el extracto, pero, hay que recordar que los resultados del tamizaje fitoquímico de *S. officinalis* L. reportaron positividad sólo para tripertenos, obteniéndose ausencia de los demás componentes, lo que lleva a concluir, que, en efecto, esta sería la causa de la débil sensibilidad ante *S. aureus*.

No obstante, la bacteria *Pseudomona aeruginosa* también alcanzó débil sensibilidad frente al extracto de *S. officinalis*, con halo de inhibición de 8mm, y aunque, este resultado en mm hiciera pensar una sensibilidad dudosa, Lina y col., (2013) estipulan en su estudio que esta bacteria no presenta sensibilidad frente al aceite esencial de *Salvia officinalis*. Asimismo, Alonso, (2004) afirma que no se ha reportado actividad inhibitoria del aceite esencial frente a *Pseudomonas aureginosa* ni sobre *Staphylococcus aureus*, pero sí hay reportes de sensibilidad frente a extractos concentrados, esto se debe a que la composición química de extractos y de aceites esenciales son distintas. Lo que permite inferir que, ciertamente, en este trabajo de investigación se logró el objetivo, confirmar que el extracto de *Salvia officinalis* L ofrece alternativa terapéutica contra este tipo de bacterias.

Asimismo, Lina y col (2013), afirman que la actividad antibacteriana de la *Salvia officinalis* L depende de los componentes de su aceite esencial, ya que en su trabajo obtuvo un amplio espectro de inhibición microbiana sobre microorganismos Grampositivos y Gramnegativos, pero usando aceites esenciales, no extractos, por lo que conviene hacer énfasis en Alonso (2004) cuando demuestra que la actividad antibacteriana de la especie de *Salvia* estaría dada fundamentalmente por el contenido de tuyonas del aceite esencial y en menor medida por otros componentes del aceite como ser peneol, alcanfor, 1,8-cineol, borneol, cariofilenoy su principio amargo picrosalvina. Es entonces, cuando se confirma la teoría que los extractos no son completamente efectivos para la evaluación antibacteriana. A esto se debe la resistencia de las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella pneumoniae*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

- De la especie *Salvia officinalis* L se logró obtener extractos etanólico y hexánico con un porcentaje de rendimiento de 5,91 % y 1,71 %, respectivamente.
- Los metabolitos secundarios detectados en los extractos etanólico y hexánico de *S. officinalis* fueron alcaloides, esteroides, componentes fenólicos y flavonoides, asimismo se estableció la ausencia de tripterenos, quinonas, cumarinas y saponinas.
- El extracto etanólico de *S. officinalis* a una concentración de 500 ppm fue inactivo frente a las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, se determinó la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se lograron los objetivos propuestos, se identificaron los principales metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta, se determinó la actividad antibacteriana de los extractos de la planta objeto de análisis, además con este estudio, se aportan nuevos datos sobre la fitoquímica y actividad biológica de la especie *S. officinalis*.

Recomendaciones:

- Profundizar en el estudio de los componentes químicos de los extractos de *Salvia officinalis* L.
- Ampliar la investigación en la búsqueda de otros metabolitos secundarios de la especie estudiada.
- Emplear otro tipo de metodologías más precisas y sensibles para la determinación de los metabolitos secundarios de la *Salvia officinalis* L.

- Investigar la actividad antibacteriana de la especie *Salvia officinalis* L partiendo del uso del aceite esencial ya que los resultados de este trabajo afirman que los extractos de la planta le confieren una actividad biológica reducida.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, L. (2000). Flavonoids of *Tagetes stenophylla* Robinson (Asteraceae) as taxonomic markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 9:62-64
- Albornoz, A. (1980). Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos (Primera Edición ed.). Rosario: CORPUS.
- Amabeoku, G., Eagles, P., Scott, G., Mayen, I. y Springfield, E. (2001). Analgesic y antipyretic effects of *Dodonaea angustifolia* an *Salvia africana-lutea*. 75(2-3):117-124.
- Araque, M., Longa, A., Ramírez, A. y Velazco, E. (2007). Manual práctico de microbiología clínica aplicada. Mérida-Venezuela:ULA
- Argueta, Z., y Vásquez, M. (2009). Aplicación del método Mitscher en la determinación de la actividad antimicrobiana de un preservante natural patentado sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. 41
- Arias, F. (2012). El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica. Editoria Episteme. 6ta edición
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal., 119-14
- Baricevic, D., Sosa, S., Della-Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A. y Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol*;75(2-3):125-32.

- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. Recuperado de [http://doi.org/10.1016/S0305-4179\(78\)80006-0](http://doi.org/10.1016/S0305-4179(78)80006-0)
- Benrezzouk, R., Terencio, M., Ferrándiz, M., Hernández M., Rabanal, R., y Alcaraz, M. (2001). Inhibition of 5-lipoxygenase activity by the natural anti-inflammatory compound aethiopinone. *Inflamm Res*;50(2):96-101.
- Botella A. (2003). Manual del auxiliar de farmacia, módulo I. Editorial Mad. España. 479.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., y Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem*, 7879-7885.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fotoquímica Plantas Medicinales (Segunda Edición ed.). Zaragoza: Editorail Acirbia S.A.
- Calvo, J., y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (1), 44-52
- Casado, E. (2012). Operaciones básicas de laboratorio. Editorial Paraninfo. España.168-169.
- Chambers, H. (2003). Antimicrobianos, consideraciones generales. Bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*. 12: 564-565.

- De Paula, J. y Martínez, A. (2000). Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. En Rev. Cubana Plant. Med. 5(1). 26-29.
- Dominguez, X. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Limusa: México
- Farnsworth, N. y Binge, R. (1977). Natural products. En J. Pharm. Sci. 55. 225.
- Fiori y Bég. (1986). Lamiaceae. Libiatae. Köhler's Medicinal Plants. 14: 95-105
- Ghannadi, A. Samsam, S., Moattar, F. (1999). Composition of the leaf oil of *Salvia hydrangea* DC. Grown in Iran. 11:745-746
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Ambito Farmaceutico. Nutricion, 80-84.
- González, E., López, E., González, E. y Tena, F. (2004). Plantas medicinales del estado de Durango. México:IPN. 25-31.
- Govaerts, R., Dransfield, J., Zona, S., Hodel, D. & Henderson, A., (2011). World Checklist of Lamiaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens.
- Guarnizo, A., y Martinez, P. (2000). Experimentos de química orgánica Con enfoque en ciencias de la vida. Armenia, Colombia: Ediciones Elizcom.
- Harborne, J. (1980). Plant phenolics. Encyclopedia of Plant Physiology. New York: Springer-Verlag. Recuperado de <http://phenoliccompounds.blogspot.com/2013/05/clasificacion-de-los-compuestos.html>
- Harborne, J. (1990). General procedure and measurement of total phenolics. In: Methods in plant biochemistry. Academic Press, USA., 1: 14-18
- Hernández, M., Rabanal, R., de la Torre, M. y Rodríguez, B. (1995) Analgesic, antiinflammatory, antipyretic and haematological effects of

- aethiopinone, and onaphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethipis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta Med*; 61(6):505-9.
- Hernández, T., Carretero M. y Accame, A. (2002). *Salvia*: Fitoquímica, farmacología y terapéutica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. UCM.
- Hold, M., Sirisoma, S., Ikeda, T., Narahashi, T. y Casida, E. (2000). Alpha-Thujone (the active component of absinthe): gammaaminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(8):3826-31.
- Jiménez J, Risco S, Ruiz T, Zaruelo A. (1986). Hypoglycemic activity of *Salvia lavandulifolia*. *Planta Med*; 261(30):260-2.
- Karousau, R., Vokou, D., Kokkini, S. (1998). Variatin of *Salvia fruticosa* essential oils on the island of Crete (Greece) 111:1-5
- Kintzios, E. (2000). *Sage: The Genus Salvia*. CRC Press. pp. 10-11
- Köhler's Medicinal Plants. (1897). Lamiaceae: *Salvia officinalis*. Lamiaceae in The Plant List, A working list of all plant species. 215:85-91
- Lamarque, A. (2008). Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Argentina. 51.
- Lara, J. (2011). Estudio fitoquímico de las hojas de *Munnozia senecionidis* Benth y determinación de la actividad antibacteriana. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela
- Lina, M., López, D., Hader, I., Castaño, P., Carlos, E. y Mejía, G. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Grupo Biotransformación, Universidad de Antioquia. Colombia.

- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata, frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá: Colombia
- López, C., Sánchez, M. y Román, J. (2010). Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima* Ort. Universidad Simón Bolívar. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México.
- López, L., Cataño, H. y Mejía, C. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Actual Biol 35: 77 - 83.
- Lu, Y. y Foo L. (2000). Flavonoid and phenolic glucosides from *Salvia officinalis*. Phytochemistry;55(3):263-7.
- Marcano, D. (2002). Fitoquímica orgánica. Editorial Torino. Segunda edición. Caracas. 32,60, 138,139, 178, 184, 217, 218, 230, 237, 238.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (1991). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas
- Martínez, J., Ruiz, C., Arias, G. y Stashenko, E. (2014), Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO₂ supercrítico. 1Centro de Investigación en Biomoléculas, CENIVAM, Bucaramanga, Colombia
- Martínez, M. (1991). Las plantas medicinales de México (*Salvia mexicana* y *leucantha*). México: Botas. 488.

- Martínez, R. (2005). Estudio Comparativo de la Actividad Antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de anitibiotico de administracion intravenosa a través de métodos in vitro. Cefepime Clorhidrato. Trabajo de Grado (Química Farmacéutica). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 9-10.
- Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M., Simões, M., Figueiredo, A., Barroso, J. & Pedro, L. (2011). *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities". En Nat Prod Res. 25(5). 526-41
- Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. Phytochemistry;58:1171-5.
- Mora, J. (2007). Implementación y Desarrollo de la Técnica de Potencia Microbiológica de Antibióticos y su Impacto Económico en la Empresa Calox S.A. Trabajo de Grado (Ingeniería en Biotecnología). Instituto Tecnológico de Costa Rica, 87.
- Mora, L. (2016). Plantas medicinales: una alternativa terapéutica. Revista médica. Caracas. Venezuela
- Newall, A., Anderson, L. y Phillipson J. (1996). Herbal Medicines. A Guide for Healthcare Professionals. London: The Pharmaceutical Press,; p. 231-2.
- Ortega, T., Carretero, M. E., y Villar del Fresno, A. (2002). Salvia. Fitoquímica, Farmacología y Terapéutica. Farmacia profesional, (9) 60-63.
- Ortuño M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Editorial Aiyana. España. 223-224
- Padilla, E. (2015). Formulación y control de calidad de un enjuague bucal elaborado a partir de los extractos totales de *Matricaria recutita* L.

(Manzanilla) y de *Salvia officinalis* L. (Salvia). Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas

Pérez Alonso, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotechnología Vegetal*, 197.

Perfumi, M., Arnold, N. y Tacconi, R. (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. from Cyprus. *J Ethnopharmacol*;34 (2-3):135-40.

Piccaglia, R., Marotti, M. y Galetti, G. (1989). Effect of Mineral Fertilizers on the composition of *Salvia officinalis* L oil. 16: 73,83

Pineda, A. (2011). Salvia: Medicina natural comprobable. *Rev. Médica*.

Pino, J., Estarrón, M. y Fuentes, V. (1997). Aceite esencial de *Salvia officinalis* L. que crece en Cuba. *J Essential Oil Res*;9 (2); 221-2.

Porte, A., Godoy, R. & Maia, L. (2013). Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). Departamento de Tecnologia de Alimentos. Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

Ramírez, A.; García, E.; Longa, A.; Sánchez, K.; Nieves, M.; Velazco, J.; Araque, M. y Mosqueda, N. (2006). Manual práctico de bacteriología general. Mérida: Editorial venezolana, C. A.

Ramírez, E. A., Árias, A. J. Vásquez, E. G., Martínez, J. R., Stashenko E. E. (2012). Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO₂ supercrítico. *Rev. Acad.Colomb.Cienc.* 36; (140): 305-316

Ramirez, S., y Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, No 42. Universidad Tecnológica de Pereira, 263-266.

- Ramos, G., Frutos, P., Giráldez, F., y Mantecón, A. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. Arch. Zootec., 597.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., (21)439.
- Rios, J., Recio, M., y Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of ethnopharmacology, 23(2), 127-149. Recuperado de [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3)
- Rivas, C., Oranday, M., y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia clínica. México 2:65-72
- Santos, P y Fernandes, M. (2001). Organ and season- dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. J Agric Food Chem;49(6):2908-16.
- Sanz, I. (2002). Prácticas de química orgánica: experimentación y desarrollo. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos (Primera Edición ed.). Santafé de Bogotá: CYTED.
- Shiva, C. (2007). Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos Orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, 15-16.
- Sierra, R., González, V., Marrero, D. y Rodríguez, E. (2011). Análisis fitoquímico de la *Salvia coccinea* que crece en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2011:16(1)54-59

- Skoula, M. El Hilali, I. Makris, A. (1999). Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem Syst Ecol.* 27: 559-568
- Stevens, P.(2013). *Lamiaceae. Angiosperm Phylogeny. Vers.* 13: 256-275
- Todorov, S., Philianos, S., Petkov, V., Harvala, C., Zamfirova, R. y Olimpiou H. (1984). Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*;10(2):13-20.
- Tsankova, E., Konaktchiev, A. Genova, E. (1994). Constituents of essential oils from three *Salvia* Species. 6:375-378
- Valdés, R., y Balbín, I. (2000). *Curso de fisiología y bioquímica vegetal.* UNAH, 89. La Habana, Cuba.
- Valle, C. (2008). Psicostasia. *Revista Virtual de Estea.* Obtenido de metabolitos secundarios de las plantas. Recuperado de http://www.psicostasia.com/nueva/psicostasia/?page_id=13
- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A. y Rondón, M., (2007). Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural product Communications* 2, 85-88
- Wang M, Kikuzaki H, Zhu N, Sang S, Nakatani N, Ho CT. (2000). Isolation and structure elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.) *J AgricFood Chem*; 48(2):235-8.
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., Lavoie, E., Huang, T., Ho, C. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.* 46: 4869–4873

- Wang, M., Shao, Y, Li J., Zhu, N., Rangarajan, M., La Voie, J. y Ho, T. (1999). Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). J Nat Prod;62(3):454-6
- Watson, L. y Dallwitz, M. (1992). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval: Labiatae.
- Watters, L. (1901). An Analytical Investigation of Garden Sage (*Salvia officinalis*, Linne). New York: Columbia University. 3:121-135
- Zarzuelo, A., Risco, S., Gamez, J., Jimenez, J., Camara, M. & Martínez A. (1990). Hypoglycemic action of *Salvia lavandulifolia* Vahl. Spp. Oxyodon: a contribution to studies on the mechanism of action. Life Sci;47(11):909-15.
- Zupko, I., Hohmann, J., Redei, D., Falkay, G., Janicsak, G. & Mathe, I. (2001). Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. Planta Med;67(4):366-8.